



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica



MICHELE RODRIGUES MARTINS

**APLICAÇÕES DA ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA NO ESTUDO DE
NEUROSFERAS E ORGANOIDES CEREBRAIS HUMANOS**

Rio de Janeiro – RJ

2021

MICHELE RODRIGUES MARTINS

**APLICAÇÕES DA ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA NO ESTUDO DE
NEUROSFERAS E ORGANOIDES CEREBRAIS HUMANOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Dr. Magno Rodrigues
Junqueira

Rio de Janeiro – RJ

2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e o apoio durante esta jornada.

Em especial, agradeço ao **Diego**, meu amor que está sempre ao meu lado, me apoiando e dando forças a cada jornada. Não consigo mensurar em palavras minha gratidão por tudo.

Minha mãe, minha **Deusa**, maior parceira que eu poderia ter. Transpôs o desejo do saber que tinha, mas que infelizmente não pode realizar, mas estou aqui nesta jornada graças a cada apoio seu!

Meu Pai, meu exemplo de nunca desistir e persistir. **Everton**, minha admiração por ti é imensa! Cada obstáculo que passo, lembro-me da sua força, e persistência e eu sigo, como você sempre faz! Obrigada

Agradeço, sobretudo, a minha família, que estiveram presentes nessa minha jornada acadêmica, com todo apoio, carinho e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos. Em especial, minha avó **Antônia**, minha segunda mãe, que me ensinou a estudar quando pequenina, que a cada passo está torcendo, rezando e iluminando meus caminhos. Minha tia, **Madalena Sofia**, por me apoiar em tudo na vida e na minha formação.

A todos os educadores que passaram por todas as etapas e a todo instituto de química, ao corpo docente, diretores e funcionários, que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. **Magno Junqueira**, pela confiança na elaboração deste projeto, me receber em seu laboratório, ser paciente, amigo, e principalmente por cada conselho e sua orientação acadêmica que foi fundamental.

Ao Prof. Dr. **Gilberto Domont**, por me acolher também em seu laboratório, com boas conversas, seus conselhos e apoio nos momentos difíceis. O maior exemplo de amor pela ciência que já tive.

Ao Prof. Dr. **Fábio Nogueira**, pelos ensinamentos, todas suas contribuições e ideias além da confiança em seu laboratório.

À Dra. **Lívia Goto pelo apoio**, pela paciência e toda assessoria. Por confiar e contribuir fortemente para este projeto.

Aos meus **amigos da Unidade Proteômica**, para os mais íntimos, UP, todos eles, que são únicos, amigos, parceiros, fizeram cada momento dos meus dias no laboratório mais felizes.

Em especial ao trio de ouro e a tríade: A **Yara Martins**, minha amiga, um ombro amigo, me socorre, auxilia, chama atenção, mas que foi essencial durante essa jornada; **Luís Felipe Ramos**, meu amigo, uma surpresa em minha vida, amo demais nossa parceria acadêmica e de vida, sou grata por tudo; **Jéssica Guedes**, um anjo, doce, parceira, uma amiga que irei levar para toda a vida, melhor farmacêutica que eu já conheci.

A uma das melhores discente que já conheci, **Natália Almeida**, uma pessoa maravilhosa, que reclama, mas auxilia a todos com seus ensinamentos.

Aos Cubanitos, **Patrícia e Maurício**, maravilhosos, cientistas sensacionais que a tive a oportunidade de trabalhar, contem comigo;

A uma querida, **Débora**, uma guria amiga que durante esses últimos meses de mestrado, o destino me proporcionou sua verdadeira e que será uma longa amizade.

Aos que passaram, agradeço demais, em especial **Andreza Raquel e Erika Velásquez** pelo carinho, acolhimento, amizade, vocês foram essenciais em cada minuto na UP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela

bolsa de estudos concedida durante o primeiro ano do mestrado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de estudos concedida no último ano do mestrado no programa Estudante Nota 10.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) da UFRJ, coordenadores, professores, técnicos e funcionários pela oportunidade e colaboração durante esses anos.

Agradeço imensamente a todos vocês!

Instituições colaboradoras:

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino,
Laboratório Prof. Stevens K. Rehen.

Artigos científicos publicados no período:

1. Livia Goto-Silva, Nadia M. E. Ayad, Iasmin L. Herzog, Nilton P. Silva, Bernard Lamien, Helcio R. B. Orlande, Annie da Costa Souza, Sidarta Ribeiro, Michele Martins, Gilberto B. Domont, Magno Junqueira, Fernanda Tovar-Moll, Stevens K. Rehen, Computational fluid dynamic analysis of physical forces playing a role in brain organoid cultures in two different multiplex platforms. *BMC Developmental Biology* 19:3 (2019). doi:10.1186/s12861-019-0183-y
2. Livia Goto-Silva*, Michele Martins*, Jimmy Rodriguez Murillo*, Leticia R.Q. Souza, Gabriela Vitória, Júlia T. Oliveira, Juliana M. Nascimento, Erick Correia Loiola, Fabio C.S. Nogueira, Gilberto B. Domont, Marília Zaluar P. Guimarães, Fernanda Tovar-Moll, Stevens Kastrup Rehen, Magno Junqueira. Quantitative profiling of axonal guidance proteins during the differentiation of human neurospheres, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1869:8 (2021). doi: 10.1016/j.bbapap.2021.140656.

Outros artigos científicos publicados no período:

Michele Martins*, Luis Felipe Costa Ramos*, Jimmy Rodriguez Murillo, André Torres³, Stephanie Serafim de Carvalho, Gilberto Barbosa Domont, Danielle Maria Perpétua de Oliveira, Rafael Dias Mesquita, Fábio César Sousa Nogueira, Rafael Maciel-de-Freitas*, Magno Junqueira*. Comprehensive Quantitative Proteome Analysis of *Aedes aegypti* Identifies Proteins and Pathways Involved in *Wolbachia pipientis* and Zika Virus Interference Phenomenon. *Front. Physiol.* 12:642237 (2021). doi: 10.3389/fphys.2021.642237

Artigos em preparação:

Proteomic analysis of brain organoids derived from iPSC from corpus callosum agenesis patients. Livia Goto-Silva*, Michele Martins*, Leticia R.Q. Souza, Gabriela Vitória, Fabio C.S. Nogueira, Gilberto B. Domont, Marília Zaluar P. Guimarães, Stevens Kastrup Rehen*, Magno Junqueira*, Fernanda Tovar-Moll*.

RESUMO

MARTINS, Michele Rodrigues. Aplicações da análise proteômica quantitativa no estudo de neuroesferas e organoides cerebrais humanos. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A neurogênese e o desenvolvimento do sistema nervoso humano são processos de alta complexidade biológica. Estudos relacionados ao neurodesenvolvimento são, normalmente, baseados em modelos animais que, de certo modo, possuem limitações, devido as suas características únicas e, principalmente, quando relacionados à origem de más-formações e doenças. Uma delas é disgenesia do corpo caloso (ACC) é uma má formação congênita em que o corpo caloso, a maior comissura ligando os dois hemisférios cerebrais encontra-se ausente ou reduzida. Uma anormalidade que pode ser associada à diversas síndromes e distúrbios neurológicos, com bases moleculares ainda são pouco conhecidas. Células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) permitem a geração modelos in vitro do encéfalo humano, pelo seu potencial de diferenciar-se estruturas teciduais complexas, como organoides, capazes de organizar, agrupar e recapitular funções semelhante a formação in vivo de um órgão. Nesta dissertação, organoides cerebrais e neuroesferas foram obtidos por reprogramação celular de células somáticas de doadores saudáveis e pacientes e, estes modelos, foram aplicados em análises proteômicas. Uma ferramenta poderosa na identificação de peptídeos, que utilizamos a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e a quantificação por iTRAQ, permitindo a identificação e quantificação relativa, em larga escala, de proteínas em múltiplas condições celulares. Três etapas foram realizadas com objetivo de compreender as mudanças no perfil proteico desses modelos e nos processos biológicos atuantes na formação do sistema nervoso. Foram realizadas análises no curso da diferenciação neural em neuroesferas humanas, visando mapear vias de sinalização representadas em diferentes estágios da maturação. Em neuroesferas diferenciadas, encontramos proteínas aumentadas nas vias relacionadas a maturação neuronal e direcionamento axonal e proteínas relacionadas ao ciclo celular diminuídas, mostrando uma boa cobertura do método para estudar proteínas e vias relacionadas a orientação axonal. A proteômica de organoides

revelou perfil proteico de regiões cerebrais embrionárias, como marcadores de prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo e, além disso, proteínas de retina. A análise quantitativa de diferentes tempos de diferenciação de organoides mostrou que a complexidade neural aumenta de acordo com o seu amadurecimento. Processos relacionados ao crescimento e orientação axonal mais expresso em 75 dias e o aumento de processos bioenergéticos e ao estresse oxidativo em 45 dias revela este período chave na de diferenciação de neurônios. Investigamos também o perfil proteico de organoides cerebrais gerados a partir de iPSC de um caso de paciente com ACC total comparado a três tempos distintos de organoides controles. Algumas funções proteicas recapitulam o perfil inicial da diferenciação, como metabolismo de RNA e ao ciclo celular. No entanto, organoides com ACC possuem características morfológicas mais desenvolvidas e observamos que o estresse celular diminui, como ocorre em organoides mais maduros. Proteínas e processos que possuem relação direta à orientação axonal são modulados, que podem fornecer novas percepções sobre desenvolvimento e projeção de axônios calosos. Em resumo, o presente trabalho oferece valiosos recursos, tanto pela metodologia proposta quanto nos dados proteômicos promissores para as questões estudadas, se destacando na caracterização de modelos neurais derivados de iPSC.

Palavras-chave: Proteômica quantitativa, iPSCs, neuroesferas, organoides cerebrais, Disgenesia do corpo caloso, neurodesenvolvimento

ABSTRACT

MARTINS, Michele Rodrigues. Applications of quantitative proteomics analysis in the study of human brain organoids and neurospheres. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Neurogenesis and the development of the human nervous system are processes of high biological complexity. Studies related to neurodevelopment are usually based on animal models that, in a way, have limitations, due to their unique characteristics and, mainly, when related to the origin of malformations and diseases. One of them is corpus callosum dysgenesis (CHD) is a congenital malformation in which the corpus callosum, the largest commissure connecting the two cerebral hemispheres, is absent or reduced. An abnormality that can be associated with several syndromes and neurological disorders, with molecular bases are still poorly understood. Induced pluripotency stem cells (iPSC) allow the generation of in vitro models of the human brain, due to their potential to differentiate complex tissue structures, such as organoids, capable of organizing, grouping and recapitulating functions similar to the in vivo formation of an organ. In this dissertation, brain organoids and neurospheres were obtained by cellular reprogramming of somatic cells from healthy donors and patients, and these models were applied in proteomic analyses. A powerful tool in the identification of peptides, we use liquid chromatography coupled with mass spectrometry and quantification by iTRAQ, allowing the identification and relative quantification, on a large scale, of proteins in multiple cellular conditions. Three steps were carried out in order to understand the changes in the protein profile of these models and in the biological processes involved in the formation of the nervous system. Analyses were performed on the course of neural differentiation in human neurospheres, aiming to map signaling pathways represented at different stages of maturation. In differentiated neurospheres, we found increased proteins in pathways related to neuronal maturation and axonal targeting and decreased cell cycle-related proteins, showing a good coverage of the method to study proteins and pathways related to axonal guidance. Organoid proteomics revealed a protein profile of embryonic brain regions, such as forebrain, midbrain and hindbrain markers and, in addition, retinal proteins. Quantitative analysis of different times of organoid

differentiation showed that neural complexity increases with maturation. Processes related to axonal growth and orientation more expressed at 75 days and the increase in bioenergetic processes and oxidative stress at 45 days reveal this key period in neuron differentiation. We also investigated the protein profile of brain organoids generated from iPSC from a case of a patient with total CHD compared to three different times of control organoids. Some protein functions recapitulate the initial profile of differentiation, such as RNA metabolism and the cell cycle. However, organoids with ACC have more developed morphological characteristics and we observed that cellular stress decreases, as occurs in more mature organoids. Proteins and processes that are directly related to axonal orientation are modulated, which can provide new insights into the development and projection of callosal axons. In summary, the present work offers valuable resources, both for the proposed methodology and in the promising proteomic data for the studied issues, standing out in the characterization of neural models derived from iPSC.

Keywords: Quantitative proteomics, iPSCs, neurospheres, brain organoids, corpus callosum dysgenesis, neurodevelopment.

SUMÁRIO

Resumo	XIII
Abreviações, símbolos e unidades	XVI
Lista de figuras	XVIII
Capítulo 1: Modelos <i>in vivo</i> do desenvolvimento de tecidos neurais humanos	20
1.1 Embriogênese e a diferenciação celular	21
1.2 O cérebro humano em desenvolvimento	22
1.3 Cultura de tecidos tridimensionais: esferóides e organoides	25
1.4 Modelos de agregados de células neurais	27
1.4.1 Neuroesferas	27
1.4.2 Organoides cerebrais	28
1.4.3 Organoides como modelos de doenças cerebrais	30
1.5 Modelos neurais da Disgenesia do corpo caloso	31
Capítulo 2: O estudo proteômico	35
2.1 A Análise Proteômica	36
2.1.1 Espectrometria de massas	36
2.1.2 Abordagens e técnicas proteômicas	38
2.1.2.1 Proteômica quantitativa	40
Capítulo 3: Justificativa e Objetivos	42
3.1 Justificativa	43
3.2 Objetivos	43
3.2.1 Objetivo geral	43
3.2.2 Objetivos específicos	44
Capítulo 4: Materiais e métodos	45
4.1. Fluxo de trabalho	46
4.2 Cultura de células iPSCs humanas	47
4.3 Cultura e diferenciação de neuroesferas	48
4.4 Cultura e diferenciação dos organoides cerebrais	48
4.3.1 Cultura e diferenciação dos organoides de células de pacientes com ACC	49
4.5 Amostras para as análises proteômicas	50
4.6 Extração e quantificação de proteínas para as análises quantitativas	50
4.7 Digestão trípica de proteínas	51
4.8 Dessalinização de amostras em micro colunas de fase reversa	51

4.9 Marcação com iTRAQ 4-plex	51
4.10 Fracionamento de peptídeos por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC)	52
4.11 Análise via espectrometria de massas (LC-MS/MS)	53
4.12 Busca por proteínas baseada em PSM	54
4.13 Análises estatísticas e de enriquecimento de genes	54
Capítulo 5: Resultados e discussão das análises em neuroesferas	56
5.1 Cultura e diferenciação de neuroesferas	57
5.2 Proteômica de neuroesferas	57
5.2.1 Correlação das proteínas identificadas	58
5.2.2 Análise proteômica quantitativa das neuroesferas	59
Capítulo 6: Resultados e discussão das análises em organoides cerebrais	67
6.1 Proteômica de organoides cerebrais	68
6.1.1 Perfil de proteínas identificadas	69
6.1.2 Análise proteômica quantitativa de organoides cerebrais	73
6.1.2.1 Proteínas diferenciais do desenvolvimento	77
Capítulo 7: Resultados e discussão das análises em organoides cerebrais com Agenesia do corpo caloso	88
7.1 Análise proteômica quantitativa de organoides cerebrais e organoides cerebrais de paciente com ACC	89
7.1.1 Proteínas diferenciais entre organoides cerebrais e organoides cerebrais com ACC	95
Capítulo 8: Conclusões e perspectivas	113
Referências bibliográficas	116
Anexos	141

ABREVIações, Símbolos e Unidades

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ACC	Agenesia do corpo caloso
ANOVA	Análise de Variância
ApoE	Apolipoproteína E
APPL2	Proteína Adaptadora, do inglês, <i>Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting With PH Domain And Leucine Zipper 2</i>
ARPP19	Fosfoproteína 19 regulada por CAMP
ARX	Do inglês, <i>Aristaless Related Homeobox</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Adenosinatrifosfatases
BCL11B/CTIP2	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11B</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês, <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
C1-THF	<i>C-1-tetrahydrofolate</i>
CAMs	Moléculas de adesão celular, do inglês, <i>cell adhesion molecules</i>
CC	Corpo caloso
CCK kinin, "mover"	Colecistocinina, do grego chole, "bile"; cysto, "saco/vesícula";
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês, <i>collision-induced dissociation</i>
CLU	Clusterina
CPSF3	Fator específico de clivagem e poliadenilação 3, do inglês, <i>Cleavage And Polyadenylation Specific Factor 3</i>

CRMP1	Proteína mediadora da resposta à colapsina 1, do inglês, <i>Collapsin Response Mediator Protein 1</i>
CRMP4	Proteína mediadora da resposta à colapsina 4, do inglês, <i>Collapsin Response Mediator Protein 4</i>
DBI	Inibidor de ligação ao Diazepam
DCC	<i>Netrin receptor DCC</i>
DCX	Do inglês, <i>Doublecortin</i>
EBs	Corpos embrióides, do inglês, <i>embryoid bodies</i>
EIF2AK4	Fator de iniciação de tradução eucariótica 2 α -quinase 4, do inglês, <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4</i>
ELAVL1	Do inglês, <i>ELAV Like RNA Binding Protein 1</i>
EM	Espectrometria de massa
ESCs	Células-tronco pluripotentes embrionárias, do inglês, <i>Embryonic stem cells</i>
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês, <i>Electrospray ionization</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPI	Glicose-6-fosfato Isomerase, do inglês, <i>Glucose-6-Phosphate Isomerase</i>
HCD	Dissociação de colisão por alta energia, do inglês, <i>High Energy Collision Dissociation</i>
HILIC	Cromatografia de interação hidrofílica, do inglês, <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HOXA1	Do inglês, <i>Homeobox Hox-A1</i>
IDOR	Instituto D'Or de pesquisa e ensino
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas, do inglês, <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>

iTRAQ	Marcadores isobáricos de quantificação absoluta e relativa, do inglês, <i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
IZ	zona intermediária interveniente, do inglês, <i>intermediate zone</i>
KCC3	Do inglês, <i>K-Cl cotransporter</i>
L1CAM	Do inglês, <i>L1 Cell Adhesion Molecule</i>
LC	Cromatografia líquida, do inglês, <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistido por matriz, do inglês, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio, do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRPS16	Do inglês, <i>Mitochondrial Ribosomal Protein S16</i>
MS	Espectrometria de massa, do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial ou em tandem
MTHFD1L	Do inglês, <i>Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (NADP+ Dependent) 1 Like</i>
nLC	Nano cromatografia líquida, do Inglês nano <i>Liquid Chromatography</i>
NOGO	Inibidor de crescimento de neurite ou <i>Reticulon 4</i>
NSCs	Células-tronco neurais, do inglês, <i>Neural Stem Cells</i>
NUP133	Nucleoporina 133
NUP98	Nucleoporina 98 e 96
NXF1	Fator de exportação de RNA nuclear, do inglês, <i>Nuclear RNA Export Factor 1</i>
PCA	Análise de componente principal

PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PSM <i>Spectrum Match</i>	Combinação de espectro de peptídeos, do inglês, <i>peptide</i>
RG	Glia Radial, do inglês, <i>Radial glial</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROBO	<i>Roundabout Guidance Receptor</i>
ROS <i>species</i>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês, <i>reactive oxygen</i>
RUFY3	Proteína RUFY3
SK	Sulfaquinina
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Superóxido dismutase, do inglês, <i>Superoxide dismutase</i>
SVZ	Zona subventricular, do inglês, <i>subventricular zone</i>
Syp/VAMP	Sinaptobrevina
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico, do inglês, <i>Tricarboxylic acid</i>
TMT	Do inglês, <i>Tandem Mass Tag</i>
TUBB2A	Cadeia β -tubulina 2A, do inglês, <i>Tubulin Beta 2A Class IIa</i>
TUBB3	Cadeia β -tubulina 3, do inglês, <i>Tubulin Beta 3 Class III</i>
TUBB4A	Cadeia β -tubulina 4A, do inglês, <i>Tubulin Beta 4A Class IVa</i>
UNC5A	<i>Unc-5 Netrin Receptor A</i>
VZ	Zona ventricular, do inglês, <i>ventricular zone</i>
ZC3H11A	Do inglês, <i>Zinc Finger CCCH-Type Containing 11A</i>
ZEB2	Do inglês, <i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemas ilustrando a fase de neurulação. A: Vista dorsal do embrião humano. B à F: Cortes transversais de embriões progressivamente mais velhos, ilustrando a formação do sulco neural, tubo neural e crista neural.	23
Figura 2 - Esquematisação do desenvolvimento do sistema nervoso central.	24
Figura 3 - Exemplo do progresso de formação de esferóides, obtidos da linhagem celular MCF-7.	26
Figura 4 - Esquema resumindo o processo de formação de um organoide semelhante ao que ocorre in vivo, recapitulando características de auto-organização do desenvolvimento de um órgão.	27
Figura 5 - Esquemas que representam a composição celular e a organização do cérebro em desenvolvimento.	29
Figura 6 - Representações do corpo caloso e as diferentes regiões corticais.	32
Figura 7 - Sistemas híbridos ESI LTQ Orbitrap Velos e ESI Q-Exactive Plus.	37
Figura 8 - Representação esquemática geral de uma análise proteômica shotgun bottom-up.	38
Figura 9 - Estratégia de marcação isobárica com iTRAQ 4-plex.	40
Figura 10 - Fluxo de trabalho da análise proteômica quantitativa baseada em iTRAQ da diferenciação de neuroesferas.	46
Figura 11 - Fluxo de trabalho das análises proteômicas em organoides cerebrais.	47
Figura 12 - Neuroesferas cultivadas por 3 dias e 10 dias.	57
Figura 13 - Identificação de proteínas em neuroesferas que estão correlacionadas com proteínas do cérebro fetal.	58
Figura 14 - Proteínas diferencialmente expressas e seus processos biológicos em termos de GO enriquecidos significativamente os entre 3 dias e 10 dias de diferenciação.	60
Figura 15 - Via completa da orientação do axônio.	62
Figura 16 - Cromatograma obtido pelo fracionamento HILIC.	68
Figura 17 - Gráfico relacionando regiões teciduais e os genes das proteínas mais abundantes, em porcentagem de genes.	69
Figura 18 - Cromatograma obtido pelo fracionamento HILIC.	73
Figura 19 - Esquema exemplificando a identificação dos íons repórteres do iTRAQ em organoides cerebrais.	74
Figura 20 – Qualidade dos dados proteômicos.	76
Figura 21 - Gráfico PCA representando os quatro estágios de diferenciação dos organoides (35 dias em vermelho; 45 dias em azul; 60 dias, em verde; 75 dias, em amarelo).	77
Figura 22 - Proteínas diferencialmente reguladas entre os estágios de diferenciação.	78

- Figura 23 - Termos GO e reactome $[-\log_{10}(\text{valor } p)]$ significativamente enriquecidos em forma de gráfico de barras dos grupos A e B com mesma tendência de expressão. 81
- Figura 24 - Termos GO e reactome $[-\log_{10}(\text{valor } p)]$ significativamente enriquecidos em forma de gráfico de barras dos grupos C e D com mesma tendência de expressão. 85
- Figura 25 - Termos GO e reactome $[-\log_{10}(\text{valor } p)]$ significativamente enriquecidos em forma de gráfico de barras dos grupos E e F com mesma tendência de expressão. 86
- Figura 26 - Ressonância magnética da região encefálica do controle e do paciente com ACC e os respectivos organoides cerebrais com 45 dias de diferenciação. 90
- Figura 27 - Cromatogramas obtido pelo fracionamento offline HILIC e cada cor corresponde a uma fração ou pool de frações analisadas via LC-MS/MS. 91
- Figura 28 - Qualidade dos dados proteômicos. 92
- Figura 29 - Gráficos PLS-DA em 2D e 3D representando os três estágios de diferenciação dos organoides (45 dias em vermelho; 60 dias, em violeta; 75 dias, em azul) e o organoide com 45 dias com ACC (em verde). 93
- Figura 30 - Gráfico representando resultado da validação cruzada 10-fold do PLS-DA. 94
- Figura 31 - Proteínas diferenciais dos organoides com ACC. 96
- Figura 32 - Diagrama de Venn das proteínas diferenciais ACC(+), em A, e ACC(-), em B. 97
- Figura 33 - Gráficos de barra contendo os pares comparativos em que ACC é regulado positivamente contra os demais tempos diferenciais de organoides. 45 dias, em A (azul); 60 dias, em B (verde); 75 dias, em C (roxo). 105
- Figura 34 - Gráficos de barra contendo os pares comparativos em que ACC é negativamente regulado contra os demais tempos diferenciais de organoides, 45 dias, em A (azul); 60 dias, em B (verde); 75 dias, em C (roxo). 109

CAPÍTULO 1

MODELOS *IN VITRO* DE TECIDOS NEURAIS HUMANOS

1.1 EMBRIOGÊNESE E A DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A diferenciação celular é um processo em que as células se especializam e passam a adquirir características distintas, devido a mudanças na expressão gênica e modificações pós-traducionais. Em conjunto com a diferenciação, processos como proliferação, interação e organização celular são essenciais para a formação e desenvolvimento dos órgãos e tecidos do corpo humano.

Durante a embriogênese, a partir de uma única célula zigoto, outras células, com essa mesma característica totipotente, são geradas e estas, darão origem a todas as outras as diferentes células de um organismo. À medida que essas células se desenvolvem, ou seja, se diferenciam, geram outras células-tronco de mesma característica indiferenciada, mas com o potencial de diferenciação diminuído (MITALIPOV; WOLF, 2009).

As células-tronco pluripotentes embrionárias (ESCs) são geradas após a diferenciação de células totipotentes em blastocistos e podem dar origem a qualquer tipo de célula fetal ou adulta, mas não podem organizar um embrião. Essas células possuem potencial de se diferenciar em qualquer uma das três camadas germinativas: endoderma, mesoderma ou ectoderma (MITALIPOV; WOLF, 2009).

A formação e desenvolvimento dessas camadas são processos fundamentais na diferenciação de todos os tecidos e órgãos de um embrião. A camada endoderma se diferencia em um tubo digestivo e um tubo respiratório no embrião. A derivação do mesoderma dará origem a regiões primitivas à formação da derme, dos músculos, dos ossos, do sistema reprodutor, das células sanguíneas e linfáticas. O ectoderma se diferencia em ectoderme cutânea e em neuroectoderme, estes tecidos darão origem a epiderme e o sistema nervoso, respectivamente (SADLER, 2016).

O isolamento e adaptação das ESCs as fazem capazes de se diferenciar reprodutivamente, *in vitro*, em diversos tipos de células distintas (DUSHNIK-LEVINSON; BENVENISTY, 1995; THOMSON, 1998). Em 2006, células somáticas foram reprogramadas pela transferência de fatores de transcrição (proteínas Oct3 / 4, Sox2, c-Myc e Klf4) que poderiam induzir a pluripotência nessas células (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Em 2007, foi possível a geração de células pluripotentes, a partir de fibroblastos adultos e outras células somáticas humanas, chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), (TAKAHASHI et al., 2007). Essa técnica levou,

em 2012, John B. Gurdon e Shinya Yamanaka a receberem o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por sua descoberta.

A criação e o desenvolvimento da tecnologia de reprogramação para geração de iPSCs, com características semelhantes às células ESCs, a partir de células adultas, permitiu avanço no estudo de células-tronco, com grande influência no campo da medicina regenerativa e da terapia clínica personalizada (DASHTBAN et al., 2020). Além disso, esse modelo pode fornecer novos conhecimentos sobre o desenvolvimento embrionário humano e em processos patológicos, bem como testes terapêuticos e descoberta de drogas (LIU et al., 2020)

1.2 O CÉREBRO HUMANO EM DESENVOLVIMENTO

O encéfalo humano é uma estrutura altamente regionalizada e heterogênea, contendo bilhões de células nervosas, com um padrão altamente complexo que também se reflete no seu processo de desenvolvimento.

A formação do sistema nervoso no período embrionário começa após a fase de gastrulação, com a diferenciação de células da camada ectoderma e a formação de uma placa neural, compondo a região neuroectoderma, num período conhecido como neurulação (SADLER, 2016). O dobramento desta placa dará origem a um tubo neural e na parte superior em contato com a epiderme, a crista neural, regiões embrionárias que constituirão o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico, respectivamente.

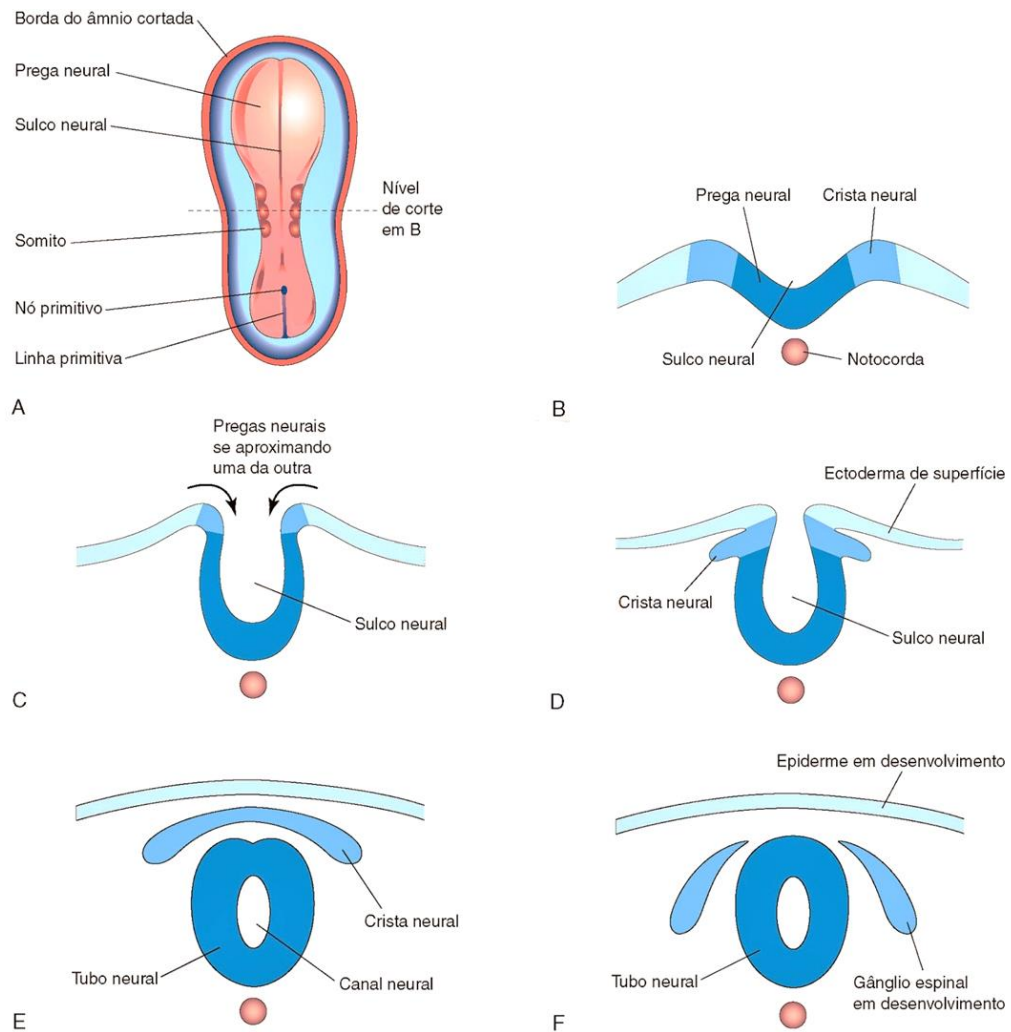


Figura 1 - Esquemas ilustrando a fase de neurulação. A: Vista dorsal do embrião humano. B à F: Cortes transversais de embriões progressivamente mais velhos, ilustrando a formação do sulco neural, tubo neural e crista neural. (Adaptado de MORRE; PERSAUD; TORCHIA, 2013)

O tubo neural representa o sistema nervoso central primitivo, com uma porção caudal estreita, a medula espinhal, e uma porção cefálica mais larga. Células neuroepiteliais fazem a composição do tubo neural e formam uma matriz chamada zona ventricular (VZ). À medida que essas células se diferenciam, tornam-se migratórias formando novas camadas: a zona intermediária e a zona marginal. Todas as regiões do SNC são elaboradas com o mesmo princípio básico, contendo essas três camadas (GILBERT; BARRESI, 2019).

O processo de proliferação de células faz com que ocorram dilatações no tubo neural e, a partir dessas dilatações, há a formação de estruturas vesiculares

encefálicas. Essas estruturas são regiões denominadas como o mesencéfalo, prosencéfalo e rombencéfalo. Posteriormente, estas estruturas formarão outras novas estruturas vesiculares secundárias, que darão origem às demais estruturas neurais do sistema nervoso adulto.

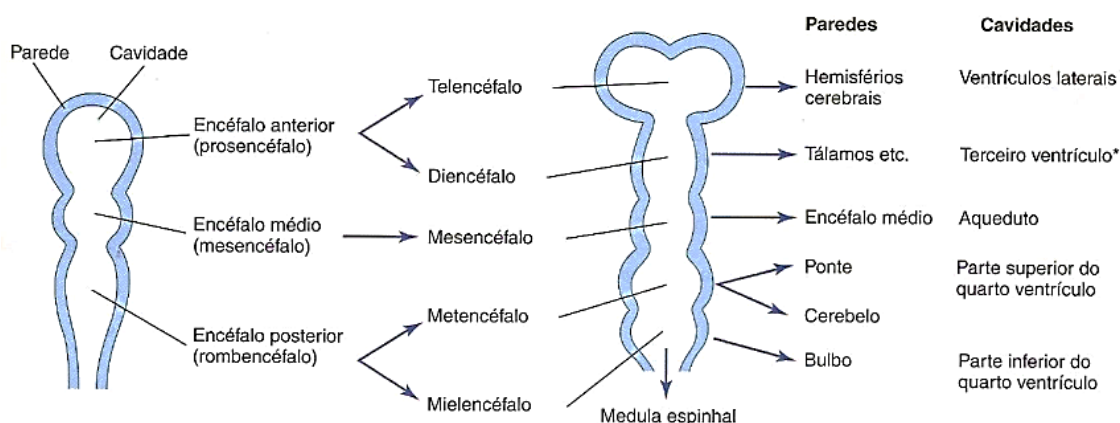


Figura 2 - Esquemática do desenvolvimento do sistema nervoso central. (Adaptado de MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2013).

O início da neurogênese começa quando células-tronco neuroepiteliais começam a mudar seu modo de divisão celular, regulam negativamente suas características epiteliais e são induzidas a gerar células gliais radiais (RG) que posteriormente se diferenciam em neurônios no córtex cerebral (BYSTRON; BLAKEMORE; RAKIC, 2008). A divisão celular de RGs geram, além de neurônios, progenitores intermediários e RG basais que se translocam e passam residir na borda de VZ, formando uma nova zona, a zona subventricular (SVZ) (KELAVA; LANCASTER, 2016; LUI; HANSEN; KRIEGSTEIN, 2011). Os neurônios formados nessas regiões usam os processos basais para migrar, através da zona intermediária que possui baixa densidade celular, para a placa cortical externa, formando seis camadas organizadas de outros neurônios antecessores (KELAVA; LANCASTER, 2016).

Comparado a modelos animais, o encéfalo humano possui características únicas que os tornam mais complexos em sua morfologia. Os camundongos são um exemplo de modelo usado em diversos estudos relacionados ao desenvolvimento cerebral embrionário, mas que apesar de sua semelhança, divergem em diversos aspectos. Quando comparado o desenvolvimento do córtex, a placa cortical em

humanos é mais expandida, a SVZ é mais desenvolvida (com a separação em um SVZ interno e externo) e o córtex, diferente do camundongo é completamente liso, é altamente dobrado com numerosos giros e sulcos. (KELAVA; LANCASTER, 2016). Neurônios surgem a partir de RG, que pode ser ausente ou pouco e rapidamente presente em roedores (LUI; HANSEN; KRIEGSTEIN, 2011).

1.3 CULTURA DE TECIDOS TRIDIMENSIONAIS: ESFERÓIDES E ORGANOIDES

Um avanço significativo nos modelos neurais, foi o desenvolvimento de modelos de cultura em que as células são crescidas em agregados tridimensionais (3D) que oferecem um contexto de que reproduz melhor as interações célula-célula presentes em tecidos humanos, quando comparado a cultivos de células em superfícies planas (culturas bidimensionais – 2D). O desenvolvimento dos modelos em 3D deve-se a enorme capacidade de auto-organização das células-tronco pluripotentes, que podem se diferenciar em estruturas similares a tecidos quando submetidos a fatores de diferenciação. A agregação *in vitro* de células ESC ou iPSC leva à formação de corpos embrióides (EBs) que compreendem as três camadas germinativas embrionárias (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000). Os EB contêm células de endoderma, mesoderma e ectoderma e são capazes de receber instruções para o desenvolvimento, semelhantes às do embrião inicial (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000).

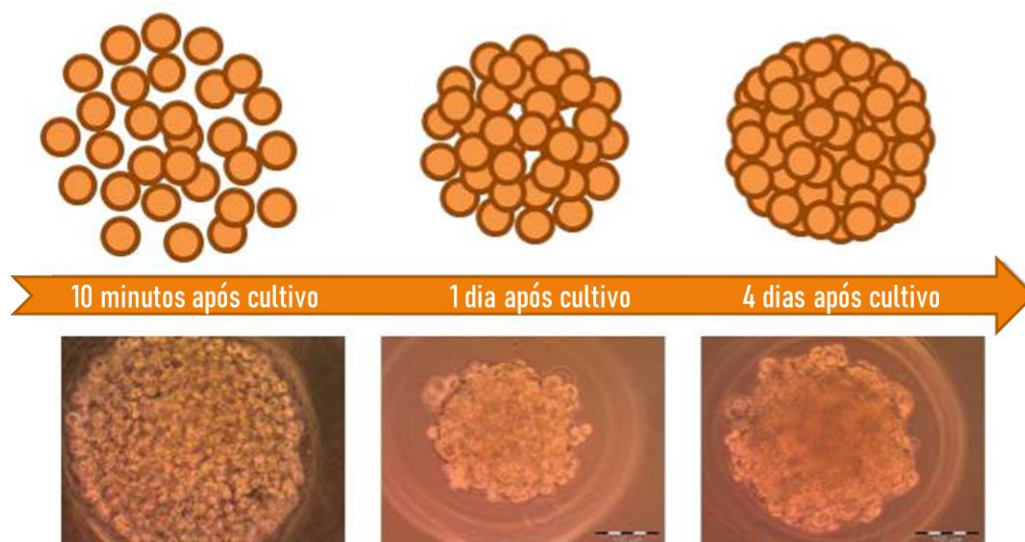


Figura 3 - Exemplo do progresso de formação de esferóides, obtidos da linhagem celular MCF-7. (Adaptado de BIAŁKOWSKA et al., 2020).

Organoides são agregados de células que podem ser diferenciados em estruturas teciduais semelhantes ao tecido humano (KIM, J.; KOO; KNOBLICH, 2020; ROZICH; BLAIR; BURKHART, 2020). Estes, caracterizam-se por conter tipos de células diferentes, específicas do órgão ao que remetem; ter a capacidade de recapitular alguma função específica deste órgão; e apresentar células organizadas em citoarquitetura similar ao órgão (LANCASTER; KNOBLICH, 2014). Organoides já foram desenvolvidos para diversos órgãos incluindo fígado, rins, intestino e cérebro (LANCASTER; KNOBLICH, 2014). Devido a semelhança extraordinária aos tecidos, podem ser muito úteis na modelagem de doenças. Além disso, também podem fornecer respostas sobre a organogênese humana.

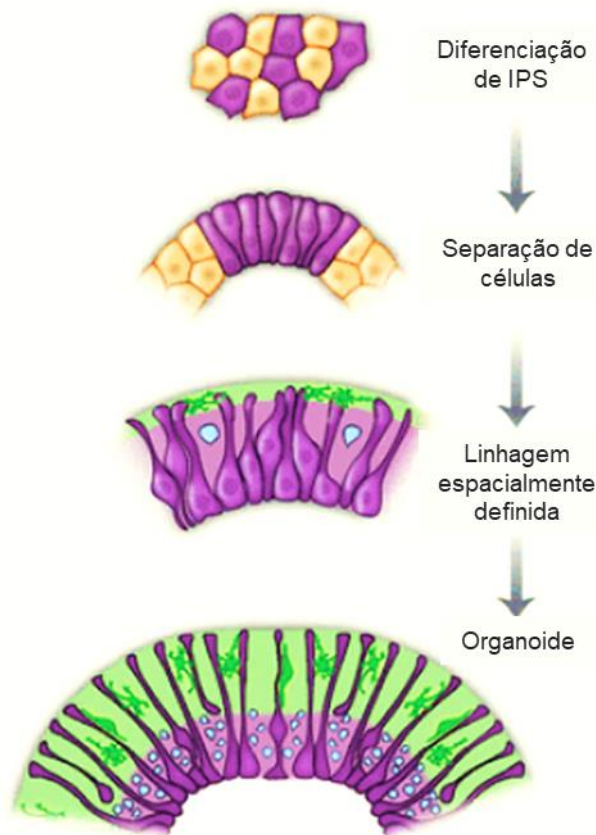


Figura 4 - Esquema resumindo o processo de formação de um organoide semelhante ao que ocorre *in vivo*, recapitulando características de auto-organização do desenvolvimento de um órgão. (Adaptado de LANCASTER; KNOBLICH, 2014).

1.4 MODELOS DE AGREGADOS DE CÉLULAS NEURAIIS

1.4.1. Neuroesferas

Em 2001, colônias de células ES cresceram como EBs flutuantes e foram direcionados a uma linhagem neural para gerar grupos de células neuroepiteliais que se auto-organizam para formar rosetas, com características que lembram o tubo neural embrionário, recapitulando as propriedades *in vivo* do RG e exibindo uma organização que lembra VZ e SVZ (ZHANG, et al., 2001).

Neuroesferas são agregados celulares gerados a partir de iPSC ou a partir de progenitores neurais, que sofrem indução para diferenciação neural. Durante a diferenciação, as neuroesferas apresentam marcadores para neurônios e astrócitos.

As neuroesferas trazem como vantagem a possibilidade de representar interações celulares complexa, envolvendo neurônios, astrócitos e progenitores, entretanto não há formação em estratos similares ao tecido cerebral. Esse modelo tem sido usado no estudo de do desenvolvimento neural, em doenças neurológicas; e como modelos para aplicações farmacológicas e de drogas neurotóxicas (ASSIS-DE-LEMOS et al., 2020; PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007; PARK et al., 2021; SIRENKO et al., 2019; WOODRUFF et al., 2020).

1.4.2. Organoides cerebrais

Organoides cerebrais possuem maior complexidade tecidual, com alta similaridade no desenvolvimento inicial do córtex humano, com zonas progenitoras semelhantes; SVZ expandidas, contendo também um SVZ externo; possui neurônios localizados em camadas que reproduzem a organização do córtex humano; com organização rudimentar da zona intermediária e com uma zona precursora da placa cortical (DI LULLO; KRIEGSTEIN, 2017; LANCASTER et al., 2013).

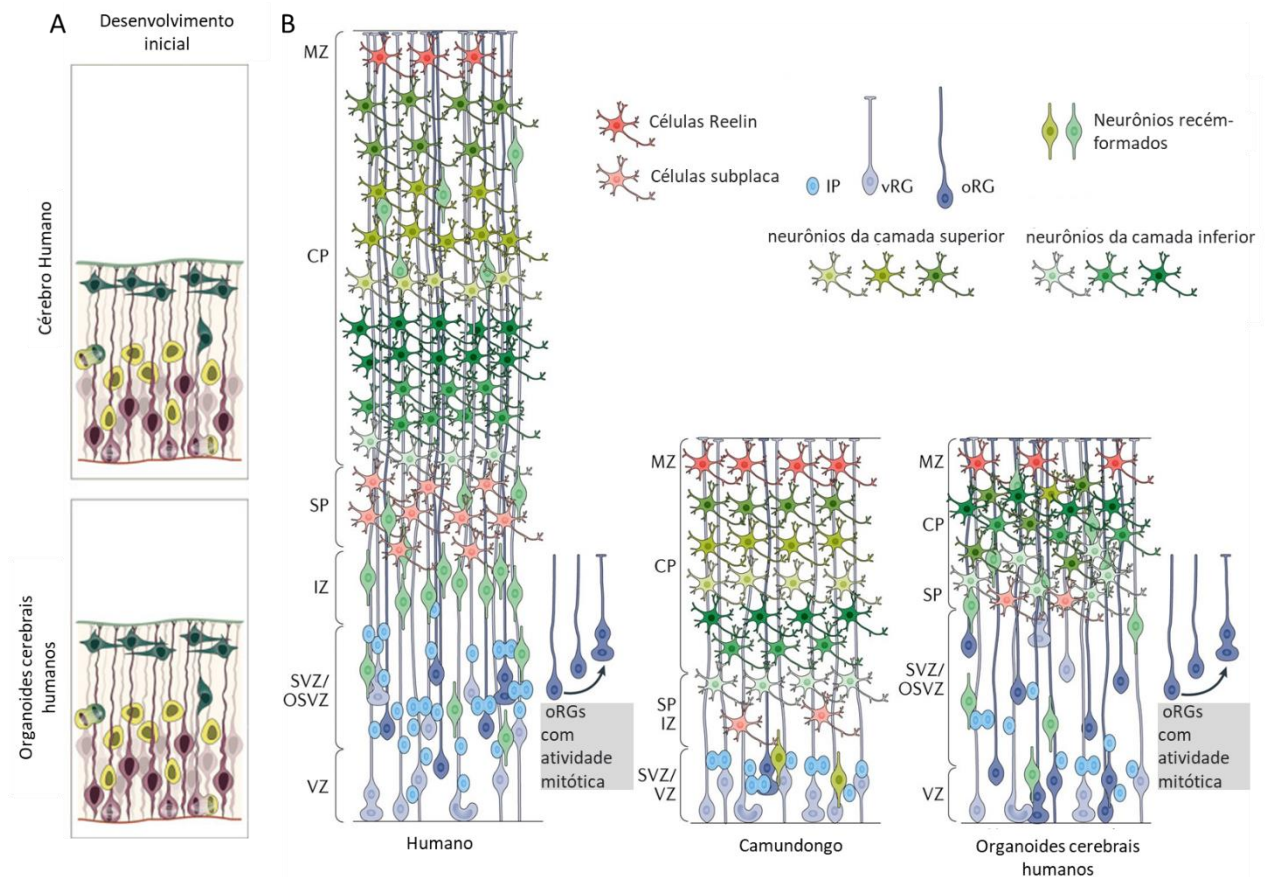


Figura 5 - Esquemas que representam a composição celular e a organização do encéfalo em desenvolvimento. A: Representação laminar de estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro humano e de organoides cerebrais, possuem um nível morfológico de complexidade semelhante. (Adaptado de KEVALA; LANCARTER, 2016) B: Representação laminar de um organoide cerebral típico, do córtex humano e de um camundongo em desenvolvimento. O córtex humano e os modelos organoides humanos compartilham uma zona subventricular expandida (SVZ), que contém um SVZ externo (OSVZ). Células gliais radiais externas (oRGs), característica da SVZ humana, são identificadas também organoides. (Adaptado de DI LULLO; KRIEGSTEIN, 2017)

Essas culturas em 3D são recentes no estudo cerebral *in vitro*, recapitulando muitas características neurais embrionárias, com semelhanças extraordinárias na citoarquitetura, na diversidade celular e na maturação durante o desenvolvimento (CHIARADIA; LANCASTER, 2020). À medida que as estruturas 3D dos organoides do cérebro se desenvolvem, diferentes tipos de células proliferam, migram e se

diferenciam. Astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, micróglia e até mesmo a reconstrução de vasculaturas foram gerados em organoides cerebrais (PORCIÚNCULA et al., 2021). Os protocolos para este tipo de cultura são diversificados e podem ser adequados quanto a complexidade e a especificidade, com métodos que enfoque em regiões cerebrais específicas, gerando modelos com maior homogeneidade ou em métodos que permita geração de sistemas complexos, com conexões e interações de várias regiões cerebrais (SIDHAYE; KNOBLICH, 2021).

Além disso, vários fenômenos biológicos que são específicos aos humanos não são passíveis de reprodução em modelos animais e esse tipo de cultura celular constitui uma melhoria na geração de sistemas modelo, com diversos tipos de células que estão em condições semelhantes às aquelas encontradas no corpo humano (KIM, J.; KOO; KNOBLICH, 2020). Um protocolo para geração de organoide de todo o encéfalo foi aplicado em modelos para microcefalia, redução cerebral causada pela produção insuficiente de progenitores neurais e neurônios durante o desenvolvimento fetal. A semelhança de VZ facilitou o estudo *in vitro* das divisões celulares orientadas em humanos. iPSCs de pacientes com mutação CDK5RAP2 foram usadas para produzir os organóides que revelaram uma diminuição nas divisões celulares simétricas, responsáveis pela expansão dos progenitores neurais, a redução das regiões neurogênicas e também a neurogênese prematura (LANCASTER et al., 2013; PORCIÚNCULA et al., 2021).

1.4.3 Organoides como modelos de doenças cerebrais

Os protocolos para culturas neurais estão em constante evolução, sendo eles direcionados a resolver questões relacionadas ao desenvolvimento cerebral e, não só ele, mas também às doenças e distúrbios que acometem o sistema nervoso. Alguns mecanismos de doenças cerebrais e novos fenótipos de doenças já foram investigados através da cultura 3D, por sua semelhança e capacidade de recapitular os processos de diferenciação, proliferação e morte celular. São protótipos com fisiologia semelhantes à complexidade neuronal, ideais para modelar o comportamento celular do sistema nervoso central, bem como manifestar falhas funcionais e alterações patológicas associadas à diversos distúrbios que anteriormente não era possível usando culturas bidimensionais de células neuronais (COLLINS; HAIGH, 2017).

A possibilidade de se utilizar células progenitoras de pacientes específicos, originadas a partir da reprogramação gênica de células somáticas, permitiu simular doenças e identificar alterações na formação cerebral do paciente da célula reprogramada. Os esferoides e organoides são um avanço da neurociência no estudo da origem e do desenvolvimento de doenças, que eram dificultados pela inviabilidade de amostras ou por limitações dos modelos pré-existentes.

Em Shou et al., (2020), e Knoblich; Sidhaye (2021), foram revisadas aplicações de organoides cerebrais na modelagem de doenças do sistema nervoso. Dentre os trabalhos publicados, baseados na cultura de organoides, eles são relacionados à distúrbios do neurodesenvolvimento, fenótipos relacionados à microcefalia e macrocefalia, transtorno do espectro do autismo (ADS e Síndrome de Rett); doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, Alzheimer e demência frontotemporal; doenças infecciosas do SNC; distúrbios psiquiátricos; transtornos relacionados à epilepsia; e efeitos da exposição aguda e crônica a toxinas. (SHOU et al., 2020; SIDHAYE; KNOBLICH, 2021).

1.5 MODELOS NEURAIIS DA DISGENESIA DO CORPO CALOSO

Uma das propostas do nosso trabalho é verificar vias e mecanismos que podem ter associação a má-formação congênita do corpo caloso, deformidade que ocorre em aproximadamente 1:4000 nascidos vivos e está associada a síndromes humanas (PAUL et al., 2007). A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi aplicada no estudo de organoides cerebrais gerados a partir de iPSCs obtidas através da reprogramação de células de pacientes com disgenesia do corpo caloso (ACC).

O corpo caloso (CC) é uma região cerebral composta por fibras nervosas que conectam os dois hemisférios cerebrais. O CC é formado principalmente por axônios neurônios piramidais, projetados de regiões corticais, com conexões do tipo inter-hemisféricas, distribuídas de forma organizada em diferentes áreas de conexões (FAME; MACDONALD; MACKLIS, 2011). Regiões calosas que conectam áreas pré-frontais e temporoparietal são caracterizadas por fibras pouco mielinizadas, finas e de condução lenta, enquanto nas regiões que conectam as áreas responsáveis por funções sensoriais, motoras e cognitivas, são de fibras altamente mielinizadas de condução rápida com maior diâmetro (ABOITIZ; MONTIEL, 2003). Essas fibras

nervosas fortemente mielinizadas fazem do CC uma estrutura de substância branca e com papel integral na transferência inter-hemisférica dessas funções.

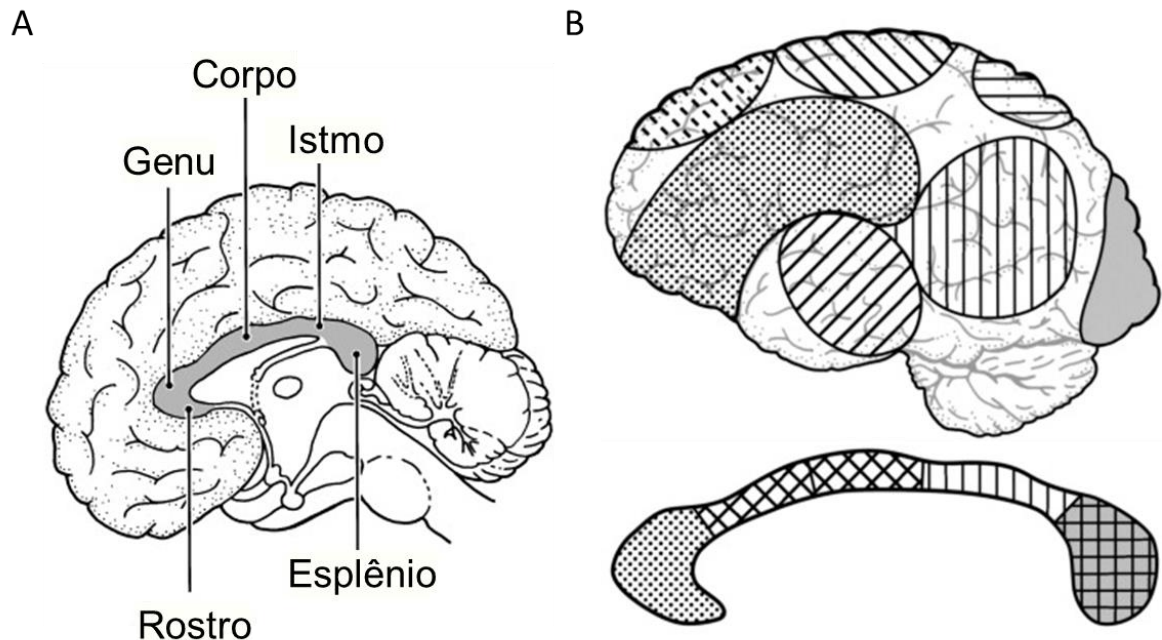


Figura 6 - Representações do corpo caloso e as diferentes regiões corticais. A: Seção transversal do cérebro com destaque da região do corpo caloso, em cinza, com a identificação das principais divisões do corpo caloso. B: Diferentes áreas do córtex onde as fibras do corpo caloso se originam e a seção do corpo caloso onde essas fibras se cruzam para o outro hemisfério. (Adaptado de BAYNES, 2002)

A formação do CC inicia-se na 12 a 13 semanas de gestação, quando as fibras rudimentares cruzam a linha média até seus alvos, dando origem às primeiras conexões corticais. No entanto, a formação e manutenção do corpo caloso depende de vários eventos em conjunto para o crescimento e a orientação correta de axônios calosos. Os axônios que formam o corpo caloso surgem principalmente de neurônios formados nas camadas corticais II / III, V e VI, juntamente com outros neurônios de mesma camada (DONAHOO; RICHARDS, 2009; FAME; MACDONALD; MACKLIS, 2011).

O processo para a formação completa do CC começa durante o desenvolvimento cortical, pois sua formação é dependente da geração dos neurônios calosos, a partir de células progenitoras na zona ventricular, da migração correta

desses neurônios e de sua diferenciação. A maturação dos neurônios de projeção calosa ocorre conforme esses neurônios estabelecem seus circuitos e conexões sinápticas com seus alvos no hemisfério oposto (FAME; MACDONALD; MACKLIS, 2011). Para que essas conexões ocorram, etapas de desenvolvimento caloso são auxiliadas e reguladas por diversos mecanismos e fatores.

A orientação dos axônios é importante processo na formação do encéfalo, no qual os neurônios estendem seus axônios, frequentemente por longas distâncias, para alcançar alvos específicos (CHILTON, 2006). Os axônios precisam ser guiados adequadamente para formar as conexões sinápticas, por meio de sinais de atração e repulsão do cone de crescimento presentes na ponta do axônio e requerem interações altamente conservadas entre ligantes extracelulares e ligantes transmembranares com seus receptores (RUSSELL; BASHAW, 2018). Vias de sinalização exercem controle sobre o movimento das células e axônios, de modo que se tornam críticas para estabelecer a conectividade neuronal adequada e alocar células funcionalmente especializadas para subdivisões do SNC e do sistema nervoso periférico (SUTER; JAWORSKI, 2019).

Os neurônios formados devem diferenciar e migrar para locais adequados que, por meio de receptores, irão direcionar axônios em direção à linha média (RAYBAUD, 2019). Múltiplas estruturas gliais estão presentes na linha média, expressam sinais para guiar o cruzamento dos axônios e os primeiros axônios a cruzar a linha média surgem, expressam o receptor de orientação neuropilina 1, desempenhando papel importante orientação durante a formação do corpo caloso (PAUL et al., 2007; PIPER et al., 2009). Após o cruzamento da linha média, respondendo a moléculas de orientação, os axônios crescem no hemisfério oposto em direção a um alvo direcionado, que geralmente é homotópica, com mesma região de origem, ou pode também ser heterotópica, com regiões diferentes como alvo (PAUL et al., 2007; RAYBAUD, 2019).

As falhas durante as diversas etapas do processo de desenvolvimento do CC resultam na ACC congênita. As causas para casos da má-formação total ou parcial podem ser resultado de fatores genéticos, infecciosos, vasculares ou tóxicos (PAUL, 2011). Nos casos de ACC, em torno de 10% possuem anomalias cromossômicas, 20-35% síndromes genéticas reconhecíveis, mas nos indivíduos com Agenesia (sem formação do CC), 75% dos casos não têm uma causa identificada (BEDESCHI et al., 2006; SCHELL-APACIK et al., 2008). A maioria dos genes já associados à ACC

codifica proteínas que possuem papéis importantes no desenvolvimento embrionário, envolvendo a migração dos neurônios (ARX), o desenvolvimento, organização e manutenção do tecido nervoso (L1CAM, KCC3, ZEB2) ou ainda a síntese de proteínas mitocondriais (MRPS16) (PAUL et al., 2007). A ACC possui complexidade genética associada a diversas síndromes e esses fatores supracitados mostram que tais genes modificadores não são somente a causa para sua ocorrência, muitas delas não são nem identificadas. Sendo assim, possivelmente exista uma regulação fina de vias, ativadas por moléculas guia, presentes durante o desenvolvimento encefálico.

Mudanças no proteoma global de organoides cerebrais vindos de pacientes com ACC poderão indicar vias e processos envolvidos na formação calosa, visto que seu desenvolvimento pode ser afetado pela interrupção da neurogênese, padrão da linha média telencefálica, migração e especificação neuronal, orientação axonal e desenvolvimento pós-orientação (EDWARDS et al., 2014).

CAPÍTULO 2

O ESTUDO PROTEÔMICO

2.1 A ANÁLISE PROTEÔMICA

No final do século passado, houve um grande avanço na área genômica e diversas técnicas de sequenciamento de genes foram desenvolvidas. Consequentemente, com desenvolvimento em grande escala dessas técnicas, diversos genomas completos foram sequenciados, porém novas perguntas, em relação a funções biológicas, continuaram a surgir.

O termo proteoma e proteômica surge na década de 1990, descrito como mapeamento de produto gênico (proteínas) de um determinado organismo em uma determinada condição biológica (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1996). A proteômica se estabeleceu como uma nova ciência no estudo de química de proteínas, com técnicas visando a identificação de proteínas em escala genômica e também análise das funções proteicas, modificações pós-traducionais, localização celular e interações proteína-proteína (CRAVATT; SIMON; YATES III, 2007; JAMES, 1997). A genômica e a proteômica são campos correlacionados. Entretanto, as informações proteômicas são diferentes das obtidas somente pelo sequenciamento genômico. As análises proteômicas possuem investigações mais complexas, dinâmicas e revelam diferentes informações e condições reais sobre o estado biológico numa célula ou tecido.

O progresso da proteômica caminhou com o desenvolvimento de diversas técnicas analíticas e computacionais. Técnicas como a separação de peptídeo/proteína por cromatografia líquida de alta eficiência e principalmente a espectrometria de massa (EM) foram cruciais para o sucesso dessa disciplina, que hoje é indispensável para a biologia molecular, celular e para o crescimento da biologia de sistemas (AEBERSOLD; MANN, 2003; JAMES, 1997).

2.1.1 Espectrometria de massas

A Espectrometria de massas (EM) atualmente é a técnica ouro na análise proteômica e suas medições são realizadas em analitos ionizados em fase gasosa. Basicamente ele é constituído por uma fonte para ionização; um analisador, que irá medir a razão massa-carga (m/z) dos íons dos analitos; e um detector que registra o

número de íons em cada valor m/z . Dois tipos de fonte de íons tornaram possíveis a análise de peptídeos e proteínas por serem técnicas mais brandas de ionização, o MALDI (do inglês, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*), que é uma técnica que o analito cristalizado em uma matriz composta por um ácido orgânico de massa molecular é ionizado por volatilização promovida por um laser UV (TANAKA et al., 1988); e o ESI (do inglês, *Electrospray ionization*) que promove a nebulização de íons do analito soluto em fase líquida sob ação de um campo elétrico, em baixa pressão atmosférica (FENN et al., 1989). O ESI ganhou popularidade imediata devido à facilidade com que poderia ser implementado com diversas técnicas populares de separação como a cromatografia em fase líquida (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001).

O analisador de massa é o protagonista em um EM. Em proteômica, seus parâmetros-chave são sensibilidade, resolução, precisão de massa e a capacidade de gerar espectros de massa de íons ricos em informações a partir de fragmentos de peptídeos (AEBERSOLD; MANN, 2003). Existem diversos tipos de analisadores que podem ser combinados em um sistema de EM, formando sistemas de EM híbridos. Com isso, análises de proteínas avançaram ao longo dos anos por conta de instrumentos melhores em resolução, acurácia, sensibilidade e velocidade que puderam ser desenvolvidos (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). Neste trabalho, foram utilizados dois modelos de sistema de EM híbridos: ESI LTQ Orbitrap Velos e ESI Q-Exactive Plus.

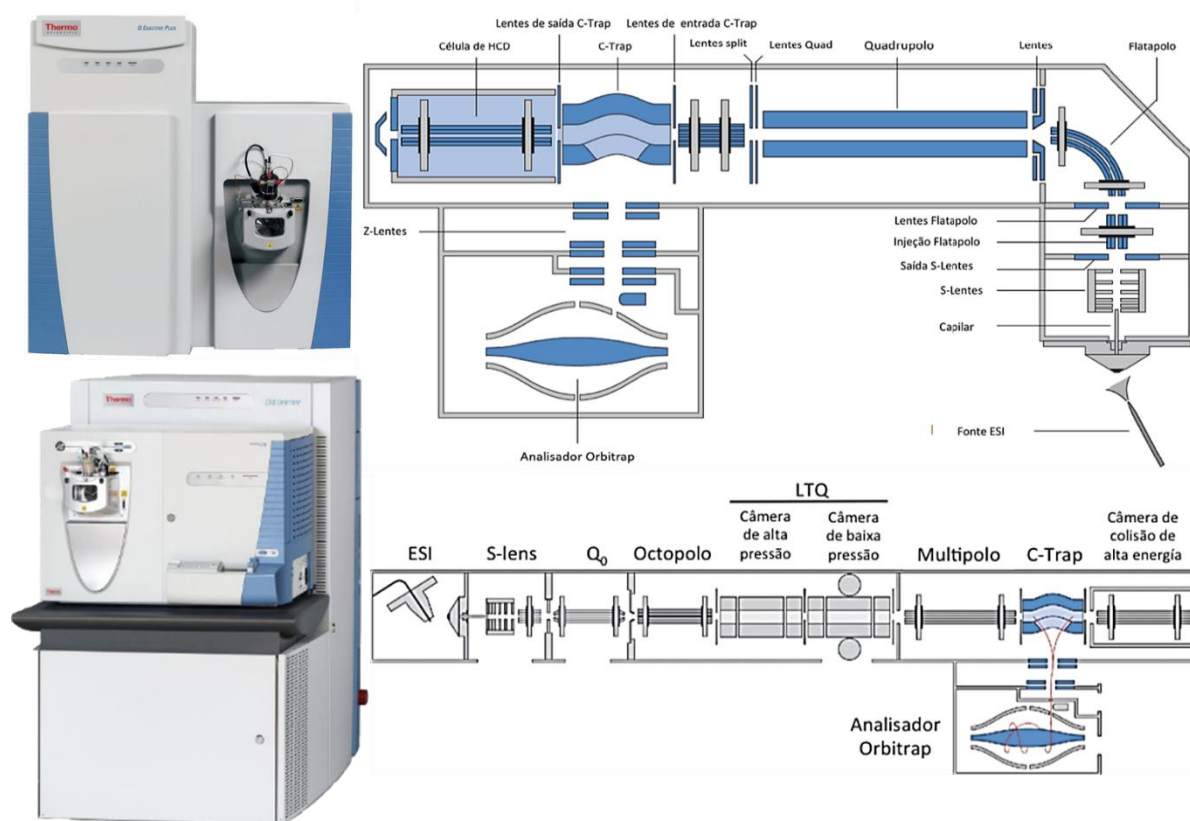


Figura 7 - Sistemas híbridos ESI LTQ Orbitrap Velos e ESI Q-Exactive Plus. Adaptado de thermo fisher scientific®

2.1.2 Abordagens e técnicas proteômicas

Umas das estratégias mais usadas na proteômica é a estratégia “*bottom-up*”, refere-se à caracterização de proteínas por meio da análise de peptídeos liberados da proteína, por meio de proteólise. Os peptídeos são mais fáceis de serem fracionados, ionizados e analisados do que proteínas intactas. A análise realizada em uma mistura de proteínas, ela é chamada de proteômica *shotgun*, que fornece uma medição indireta de proteínas por meio de peptídeos derivados da digestão proteolítica (ZHANG, Y. et al., 2013).

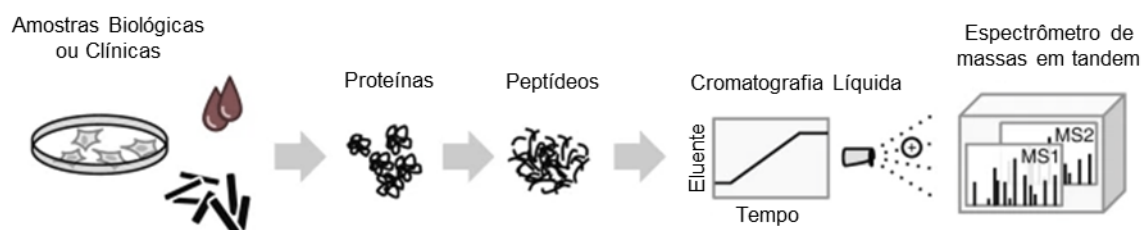


Figura 8 - Representação esquemática geral de uma análise proteômica *shotgun bottom-up*. (Adaptado de SCHUBERT et al., 2017).

A proteólise, comumente usada, é realizada por meio de reações utilizando enzimas, que possuem sítios específicos de clivagem de diferentes aminoácidos. A proteína mais comum para esse fim é a Tripsina e sua ação de clivagem ocorre logo após resíduos de arginina (R) e lisina (K) (no sentido C-terminal, não acompanhados de prolina (P)). Embora o ESI seja um método poderoso e relativamente imparcial para a introdução de peptídeos na fase gasosa, ele pode ser facilmente prejudicado pela supressão de ionização.

Peptídeos altamente abundantes derivados de uma amostra biológica de alta complexidade pela supressão de ionização ofuscam parcialmente a detecção de outros peptídeos presentes na mistura (SANDRA et al., 2009; ZHANG, Y. et al., 2013). A separação de peptídeos por cromatografia líquida é crítica para a sua detecção em uma mistura proteica complexa, uma vez que as diferenças de carga e hidrofobicidade podem ser exploradas (ZHANG, Y. et al., 2013).

No entanto, mesmo com a técnica de cromatografia líquida associada à EM (LC-MS/MS), a análise de amostras altamente complexas ainda sim permanece desafiadora. A clivagem tríptica na proteômica *bottom-up* gera centenas de milhares de peptídeos numa amostra e com grandes diferenças de concentração, que resulta em um número reduzido de identificações peptídicas e aumento na variabilidade da análise (ZHANG, X. et al., 2010). Uma forma melhorar a análise proteômica de amostras biológicas é utilizar sistemas de cromatografia líquida multidimensional, em que dois ou mais métodos ortogonais de separação independentes são usados para maximizar a capacidade de pico e as detecções no EM (SANDRA et al., 2009). Um exemplo de seletividade complementar é a combinação da cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) com a cromatografia líquida de fase reversa em pH ácido, que são altamente ortogonais e juntas formam um sistema ideal para separação de amostras

complexas contendo compostos polares, como peptídeos e proteínas (XIE; SMITH; SHEN, 2012; ZHANG, X. et al., 2010).

1.1.2.1 Proteômica quantitativa

A partir dos dados que a proteômica baseada em EM fornece, podemos descobrir biomarcadores, mecanismos e processos que estão relacionados a abundância das proteínas. A quantificação de proteínas é um ponto importante nos estudos de biologia de sistemas, porque pode prover informações sobre o estado de uma célula ou tecido sob diversas condições

Diversas abordagens para proteômica quantitativa foram desenvolvidas ao longo do tempo e, no geral, são estratégias baseadas em marcação (label-dependent) ou sem marcação (label-free). Além disso é possível fazer a quantificação absoluta, em que se determina a concentração da proteína, e/ou a quantificação relativa, em que se estima mudanças na abundância na proteína (BANTSCHEFF et al., 2012; SCHUBERT et al., 2017).

A marcação isotópica é um padrão outro na quantificação relativa de proteínas. A marcação é realizada antes da análise por MS/MS, pela aplicação de isótopos pesados de C, H, N e O e pode ser introduzida em proteínas por meios metabólicos ou por meio de processos de derivatização química (RAUNIYAR; YATES, 2014). Um desses métodos por derivação é utilizando marcadores isobáricos, que possuem massa total idêntica, quando os peptídeos são marcados, mas cada um possui uma variante isotópica diferente. São comercializados como iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) ou TMT (*Tandem Mass Tag*).

Este tipo de marcação permite que as amostras sejam agrupadas e analisadas simultaneamente em LC-MS/MS. Os peptídeos são submetidos à ionização por eletrospray e, no espectrômetro de massa, ocorrem dois níveis de medição em tandem (AEBERSOLD; MANN, 2003). Primeiramente, um analisador de massa mede m/z de íons dos peptídeos gerando o espectro MS^1 . Em seguida, uma lista desses peptídeos é selecionada e isolada para fragmentação e são detectados valores m/z de íons fragmentados resultantes gerando espectros de MS^2 ou MS/MS (AEBERSOLD; MANN, 2003; SCHUBERT et al., 2017). Os peptídeos de mesma sequência de diferentes amostras aparecem com um pico único no MS^1 e durante o

evento de MS^2 são gerados picos de íon repórter, com as massas distintas, e picos de íon fragmentados do peptídeo.

Para aumentar o número de peptídeos processados, a aquisição dependente de dados (DDA) é o método mais comum utilizado para controlar o processo de aquisição dos espectros em análises shotgun (GRAUMANN et al., 2012). Os métodos DDA realizam uma varredura de precursor e selecionam-se os íons mais abundantes no MS^1 , com a criação de uma lista de exclusão dinâmica de precursores. As informações processadas são armazenadas em um arquivo bruto que é pode ser analisado com um algoritmo de busca baseado nas correspondências de espectro de peptídeos (PSMs) teóricos, por simulações *in sílico* de um banco de dados existente e os espectros experimentais (GOLDFARB; WANG; MAJOR, 2016).

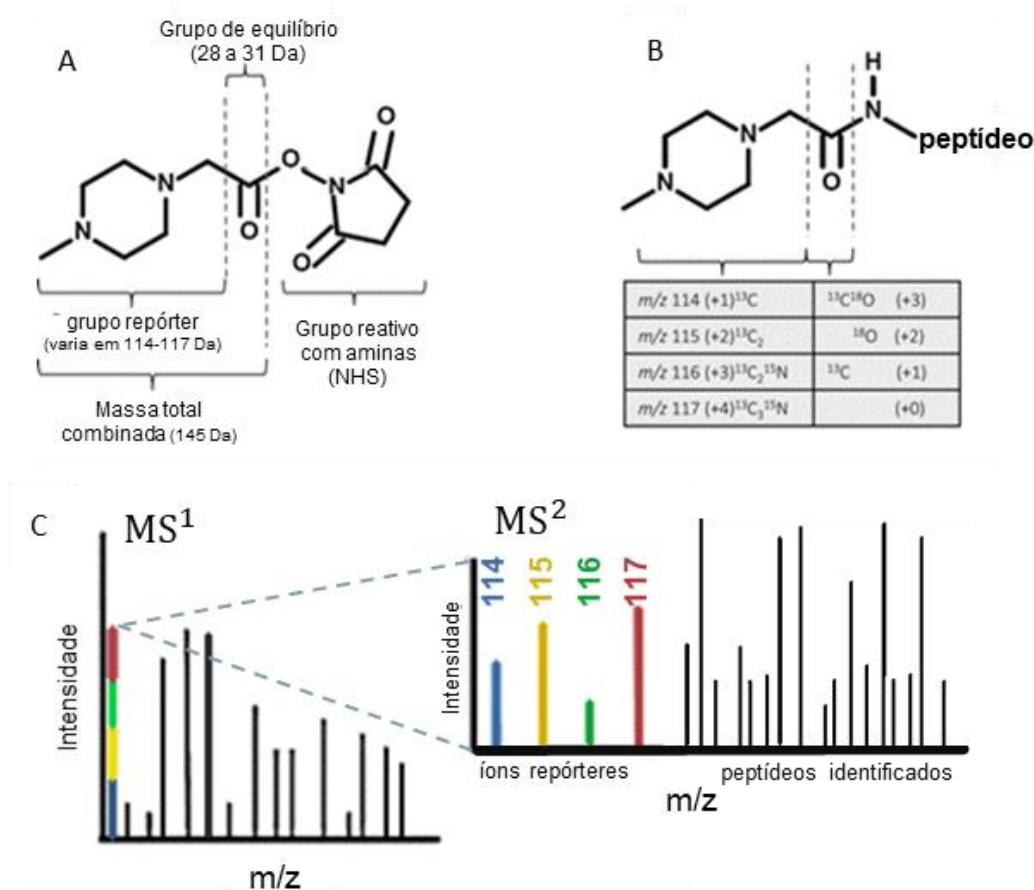


Figura 9 - Estratégia de marcação isobárica com iTRAQ 4-plex. A: Estrutura do reagente iTRAQ. B: Ligação da tag, com grupos repórteres de diferentes massas, na região N-terminal do peptídeo. C: Na análise via LC-MS/MS os peptídeos marcados aparecem como um único íon precursor no MS^1 e após a fragmentação do íon precursor, durante MS^2 , os quatro íons repórter aparecem como massas distintas entre m/z .

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

As células iPSC podem ser diferenciadas em tipos distintos de neurônios e constituem uma ferramenta para explorar o mecanismo de distúrbios neurológicos humanos, o que pode contornar os problemas levantados pela divergência entre os tipos de células e espécies (IMAIZUMI; OKANO, 2014; ONDER; DALEY, 2012). Igualmente, as células iPSC são um excelente modelo para estudar o neurodesenvolvimento humano e até o momento, não existem estudos em ACC com o modelo de células reprogramadas.

A reprogramação de células somáticas obtidas a partir da urina de pacientes, por ser um método não-invasivo, se torna mais adequado para a obtenção de amostras, visto que em grande parte dos estudos há diversas limitações relacionadas inviabilidade de amostras de tecidos obtidas de pacientes vivos e também nos modelos animais existentes, contornando pela divergência entre os tipos de células e espécies.

O modelo 3D *in vitro* consiste na utilização de células obtidas de bancos celulares e de paciente com ACC reprogramadas e diferenciadas em diferentes tecidos a partir da formação de modelos teciduais. Usamos uma estratégia baseada em rotulagem iTRAQ para analisar o perfil proteico em diferentes situações: Do processo diferenciação de neurônios no SNC, em neuroesferas; ao longo do desenvolvimento neural, em organoides; e de organoides de células de paciente com ACC comparado a diferentes controles.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Implementar uma metodologia robusta para a análise proteômica quantitativa de modelos neurais de cultura *in vitro* para identificar e quantificar proteínas chaves no processo de desenvolvimento de neuroesferas e organoides cerebrais humanos.

3.2.2 Objetivos específicos

- Analisar quantitativamente o proteoma de neuroesferas e organoides cerebrais humanos, utilizando a espectrometria de massa juntamente a estratégia de marcação isobárica com iTRAQ 4-plex.
- Comparar quantitativamente os perfis proteômicos de neuroesferas cultivadas e estudar a influência de proteínas na diferenciação celular neuronal.
- Determinar o proteoma de organoides
- Comparar quantitativamente os perfis proteômicos de organoides Verificar o perfil das proteínas diferencialmente expressas ao longo do desenvolvimento.
- Comparar o perfil de proteínas de organoides controles, em diferentes tempos, com organoides gerados um paciente com disgenesia total do corpo caloso (ACC)
- Estudar as vias e processos relacionados as proteínas diferencialmente reguladas em ACC
- Comparar os resultados quantitativos com a literatura para compreender as mudanças no perfil proteico e determinar proteínas e processos chaves durante o desenvolvimento dos neurônios.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FLUXO DE TRABALHO

Foram realizados estudos utilizando a abordagem da proteômica quantitativa com marcadores isobáricos químicos, o iTRAQ. As análises de neuroesferas foram realizadas em uma fase experimental, onde foram utilizadas duas replicatas biológicas de neuroesferas em culturas rotacionais em suspensão com meio de diferenciação em dois tempos, por 3 e 10 dias. A figura 10 ilustra um esquema simplificado desta etapa.

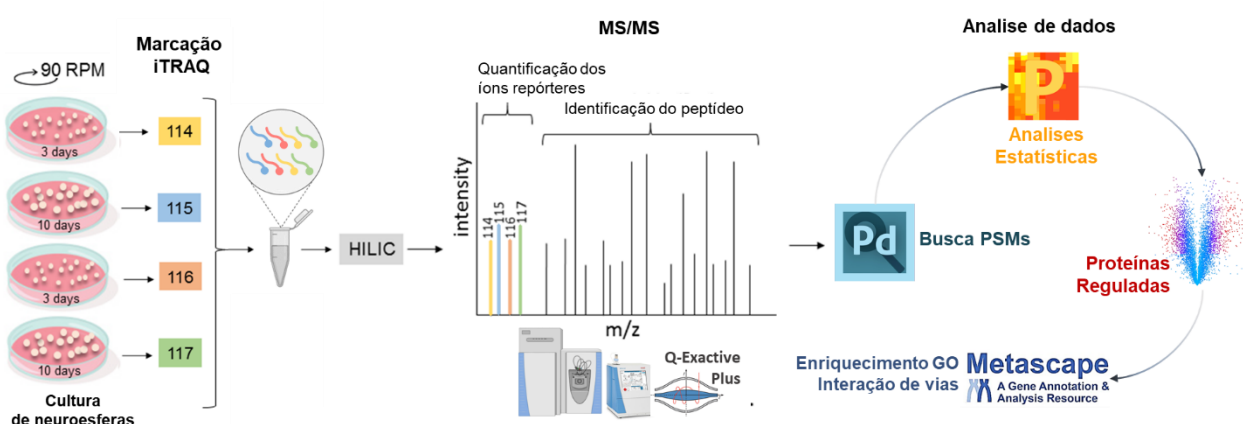


Figura 10 - Fluxo de trabalho da análise proteômica quantitativa baseada em iTRAQ da diferenciação de neuroesferas.

As análises de organoides cerebrais foram realizadas em três fases experimentais. A primeira etapa consistiu em obter o proteoma total dessa cultura. Foi feita a partir de um *pool* de organoides do menor estágio de diferenciação, com 35 dias, em duplicata biológica. A figura 11-A, ilustra um esquema simplificado de como foi realizada esta análise. A segunda etapa consistiu em uma análise quantitativa, comparando diferentes tempos de diferenciação do organoide. Foi utilizado novamente *pool* de organoides de quatro diferentes estágios (35 dias, 45 dias, 60 dias e 75 dias) em uma estratégia utilizando marcação isotópica estável, *label-dependent*, para a quantificação das proteínas. A figura 11-B, ilustra um esquema simplificado de como foi realizada esta análise. A terceira etapa consistiu em uma outra análise *label dependent* comparando organoides cerebrais, obtidos por IPS reprogramadas de células de paciente com ACC, com organoides cerebrais em diferentes tempos de diferenciação. Foram utilizados *pool* de organoide cerebrais de três estágios diferentes (45 dias, 60 dias e 75 dias) em comparação com organoides proveniente

de células de pacientes com ACC, em triplicata biológica. A metodologia de análise está resumida na figura 11-C.

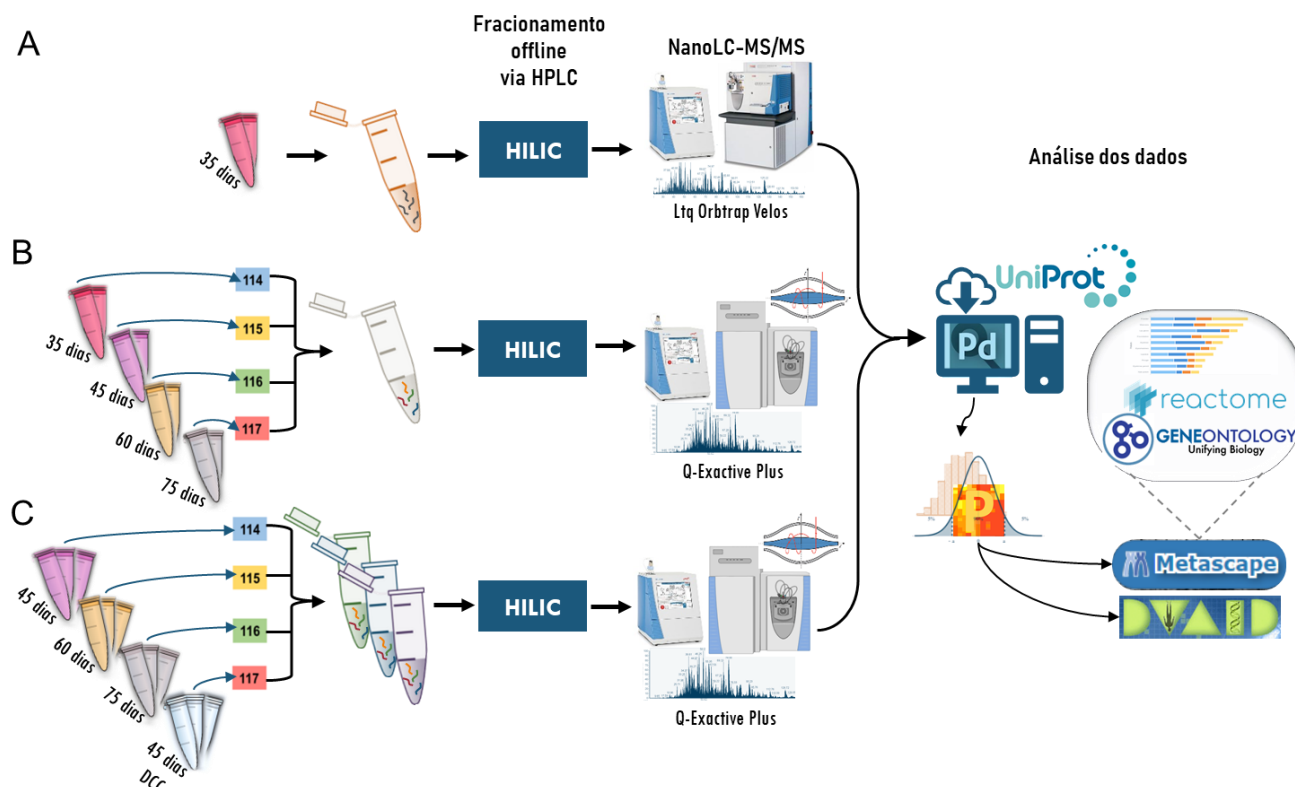


Figura 11 - Fluxo de trabalho das análises proteômicas em organoides cerebrais. A: Análise label-free dos organoides cerebrais de 35 dias de diferenciação. B: Análise label-dependent (iTRAQ) dos organoides cerebrais em diferentes tempos de diferenciação. C: Análise label-dependent (iTRAQ) comparando organoides cerebrais obtidos por IPS reprogramadas de células de pacientes com ACC, com organoides cerebrais de diferentes tempos de diferenciação.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS iPSCs HUMANAS

As iPSCs humanas foram obtidas no repositório do Coriell Institute for Medical Research (GM23279A) do repositório de células *NIGMS Human Genetic Cell Repository* ou produzidas internamente com o kit de reprogramação Sendai CytoTune™ - iPS 2.0 (Invitrogen) a partir de fibroblastos da pele (DA SILVEIRA PAULSEN et al., 2012) ou células epiteliais da urina (SOCHACKI et al., 2016). As iPSCs humanas foram mantidas em meio Stem Flex (Thermo Fisher Scientific), em

placas revestidas com Matrigel (BD Biosciences) à 37°C, em ar umidificado com 5% de CO₂. Os meios de cultivo eram trocados diariamente para evitar a diferenciação de culturas. As colônias foram divididas manualmente ao atingir 70-80% da confluência. A diferenciação para NSCs foi induzida por cultivo em meio de indução neural PSC, contendo meio Neurobasal e suplemento de indução neural (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. O meio foi trocado em dias alternados até o dia 7, durante o qual as NSCs foram divididas e expandidas em meio de expansão neural (1:1, Advanced DMEM / F12 e meio Neurobasal) com suplemento de indução neural (Thermo Fisher Scientific).

4.3 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE NEUROESFERAS

A geração de neuroesferas e sua diferenciação foi feito em parceria com o Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR) conforme descrito em Neuroesferas para análise proteômica foram preparadas em suspensão da seguinte forma: ao atingir 90% de confluência, NSCs foram destacados da placa usando accutase (Merck Millipore), centrifugados a 300 xg por 5 minutos e ressuspensos em meio de indução neural com DMEM 1: 1 / F12 (Life Technologies) e meio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1x N2 (Invitrogen) e 1x B27 (Thermo Fisher Scientific). 3 x 10⁶ NSCs foram colocados em cada poço de uma placa de 6 poços e cultivados em um agitador orbital a 90 rpm por 3 ou 10 dias a 37 ° C em ar umidificado com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 3-4 dias (CASAS et al., 2018).

4.4 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DOS ORGANOIDES CEREBRAIS

A geração de organoides e sua diferenciação foi feito em parceria com o Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR) conforme descrito em GOTO-SILVA et al. (2019). Colônias de iPSC cultivadas em placas de seis poços foram dissociadas com 1 ml de solução de descolamento de células Accutase (MPBio, EUA) por 4 min a 37 ° C e 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS; LGC Biotechnology, EUA) foi então adicionado. A solução resultante foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e 20 µl de inibidor de Rho-quinase 10 mM (ROCKi, Y27632; Merck Millipore, EUA) foram adicionados antes da centrifugação para obter uma concentração final de 10 µM. As células foram contadas em um hemocitômetro e centrifugadas a 300 × g por 4

minutos. As células foram plaqueadas em meio hESC contendo 50 μ M de ROCKi e 4 ng/ml de b-FGF. O meio hESC continha 20% de substituição de soro sem BSA (Life Technologies), 3% de soro fetal bovino de qualidade ESC (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1% de GlutaMAX (Life Technologies, Canadá), 1% de aminoácidos não essenciais de meio essencial mínimo (MEM-NEAAs; Life Technologies), 0,7% de 2-mercapto-etanol e 1% de penicilina-estreptomicina (P/S; Life Technologies). Foi utilizado 9.000 células/poço de uma placa de 96 poços, que demonstrou levar à formação de organoides eficientes nas condições de cultivo. As placas de 96 poços foram centrifugadas por 1 min a $300 \times g$ para melhorar a agregação inicial de EB.

Após o dia 1, os corpos embrióides (EBs) foram cultivados e o meio foi trocado a cada 48 h após o plaqueamento por 6 dias. No dia 6, os EBs foram transferidos para placas de cultura ultralow-attach de 24 poços (um/poço) contendo 0,5 ml de meio de neuroindução [1% de suplemento de N₂ (Gibco), 1% de GlutaMAX (Life Technologies), 1% de MEM-NEAAs, 1% P/S e 1 μ g/ml de heparina em DMEM/F12 (Life Technologies). Após 4 dias (dia 10), seis organoides foram revestidos com Matrigel em uma placa de cultura de tecido não aderente de 60 mm, diluídos de 3 ml e incubados por 1 h à 37 °C sob 5% de CO₂. Os organoides revestidos foram devolvidos às placas de fixação ultrabaixa de 24 poços com 0,5 ml de meio de neurodiferenciação sem vitamina A (50% de meio neurobasal, 0,5% de N₂, 1% de suplemento de B 27 sem vitamina A, 1: 100 2-mercaptoetanol, 0,5% MEM-NEAA, 1% GlutaMAX e 1: 100 P/S em DMEM/F12) e deixado por 4 dias em cultura estática. Posteriormente, os organoides cerebrais foram cultivados em suspensão em placas de direção em um agitador orbital padrão (placas de cultura de seis poços), agitado a 90 rpm. Dez organoides foram colocados em 3 ml de meio de neurodiferenciação com vitamina A (dia 14). O meio foi mudado semanalmente até o 60 de cultura. Eles foram fotografados com um sistema de imagem de células EVOS (Thermo Fisher Scientific) em campo claro. A área, o diâmetro e a circularidade de organóides cerebrais individuais foram realizadas usando uma macro customizada no ImageJ.

4.3.1 Cultura e diferenciação dos organoides de células de pacientes com ACC

A cultura das células iPS foi realizada a partir da urina de um paciente (SOCHACKI et al., 2016). O voluntário foi esclarecido sobre o estudo e o próprio (ou o responsável legal) assinou um termo de consentimento. O Projeto foi aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq, IRB00000921; CAAE 32385314.9.0000.5249; INTO 025/2014; HCD 699.862; HCD 978.457) e todos os aspectos de bioética e biossegurança foram contemplados de acordo com a recomendação do comitê de ética.

Células somáticas foram reprogramadas diretamente utilizando vetores de reprogramação com os quatro fatores, Oct3 / 4, Sox2, Klf4 e c- Myc (SOCHACKI et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2007). As colônias são selecionadas quanto a sua pluripotencialidade e pela capacidade de diferenciação, caracterizada pela formação de corpo embrionário (EB) e expressão de marcadores para três camadas germinativas (idem).

4.5 AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES PROTEÔMICAS

Para o estudo proteômico utilizando neuroesferas, foram utilizados aproximadamente **n?** células de neuroesferas para cada condição e/ou replicata biológica. Para o estudo proteômico de organoides cerebrais, foram utilizados *pool* com três organoides cerebrais da mesma cultura para cada condição e/ou replicata biológica.

4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA AS ANÁLISES QUANTITATIVAS

A extração de proteínas foi realizada conforme metodologia previamente descrita em MURILLO et al., (2018). A extração foi realizada utilizando um tampão com uréia 7M, tiouréia 2M, HEPES 50 mM pH 8, NaCl 75 mM, EDTA 1mM e coquetel de inibidores de proteases complete (roche). Uma vez adicionado o tampão, a solução foi homogeneizada suavemente com micropipeta e posteriormente submetida a banho de ultrassom com frequência de 40 kHz durante 10 minutos e, em seguida, foi feita a centrifugação a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado para fazer os processos de quantificação e digestão de proteínas. Esse método foi aplicado em todas as amostras e etapas desta dissertação.

As proteínas obtidas após processo de extração foram quantificadas pelo ensaio fluorométrico *Qubit® 2.0* (Invitrogen) utilizando 1µl de amostra conforme instruções do fabricante. Esta metodologia foi utilizada também para quantificar os

peptídeos processados nos diferentes passos do protocolo geral.

4.7 DIGESTÃO TRÍPTICA DE PROTEÍNAS

Foram processados volumes equivalentes a 100 µg de proteína para realizar a digestão. Inicialmente, as amostras foram incubadas para redução das pontes dissulfeto com tris(2-carboxietil) fosfina hidrocloreto (TCEP) à concentração final de 10 mM à 30°C por uma hora. Posteriormente, foi adicionada iodoacetamida (IAA), para a alquilação, até uma concentração de 40 mM a temperatura ambiente no escuro por 30 minutos. A mistura foi diluída 10 vezes utilizando tampão bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 50 mM para reduzir a concentração de uréia/tiouréia na posterior hidrólise enzimática. A reação foi realizada com a enzima tripsina em uma proporção de 1:50 (m/m) à 35°C, pH 8, durante 18 horas. A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) 10% até uma concentração final de 0.1% em pH 2, aproximadamente.

4.8 DESSALINIZAÇÃO DE AMOSTRAS EM MICRO COLUNAS DE FASE REVERSA

A dessalinização das amostras na metodologia geral foi feita utilizando a resina de fase reversa. As amostras foram processadas em *stage tips* confeccionadas com resina POROS™ R2 (Applied Biosystems) previamente lavadas com Acetonitrila (ACN) 100% e equilibradas com TFA 0.1%. As amostras foram incubadas com a resina e eluídas manualmente ou por centrifugação a 2000 rpm (duas vezes). Posteriormente, a resina foi lavada três vezes com TFA 0.1% e os peptídeos retidos foram eluídos sequencialmente com ACN 50% / TFA 0.1% e ACN 70% / TFA 0.1%. Em seguida, foram secos a vácuo em um concentrador do tipo *speedvac*.

4.9 MARCAÇÃO COM ITRAQ 4-PLEX

Nos quatro estágios de desenvolvimento, foram marcados os peptídeos procedentes de cada condição de diferenciação. Sendo assim, na segunda etapa, o canal 114 correspondeu ao estágio 35 dias, o canal 116 ao de 45 dias, o canal 115 ao de 60 dias e o canal 117 ao de 75 dias, de acordo com figura 14. Na terceira etapa, além dos estágios de diferenciação, foi utilizado o estágio 45 dias proveniente de iPSC

reprogramada de paciente com ACC. O canal 114 correspondeu ao tempo de 45 dias de diferenciação, o canal 116 correspondeu ao tempo de 60 dias, o 116 correspondeu ao tempo de 75 dias e o 117 correspondeu ao tempo de 45 dias de células obtidas de paciente com ACC total, conforme a figura 15.

Seguindo as instruções do fabricante (AbSciex), foi padronizado a quantidade de peptídeo de cada amostra para cada um dos reagentes do iTRAQ. Inicialmente, os peptídeos foram solubilizados em 30 µl de TEAB 20mM, pH 8.5 e adicionado o respectivo reagente iTRAQ previamente dissolvido em etanol absoluto (concentração final de etanol na mistura de 70% v/v), a reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora, posteriormente. As soluções dos 4 reagentes serão misturadas em um único tubo e concentradas até um volume de aproximadamente 10 µL (NÚÑEZ; DOMONT; NOGUEIRA, 2017).

4.10 FRACIONAMENTO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA (HILIC)

As misturas das amostras marcadas com iTRAQ foram fracionadas por cromatografia HILIC. Foi realizado o mesmo protocolo para a amostra de 35 dias de desenvolvimento livre de marcação. As amostras previamente secas foram ressuspendidas em ACN 90%/TFA 0.1% e injetadas no cromatógrafo UFLC Shimadzu utilizando uma coluna TSKGel Amide-80 (15 cm x 2 mm i.d. x 3 µm - Supelco), fluxo de 0.2 ml/minuto; fases móveis A (ACN 85%/TFA 0.1%) e B (TFA 0.1%); gradiente: 0% de B durante 5 minutos; 0% a 10% de B em 5 a 10 minutos; 10% a 20% de B em de 10 à 55 minutos; 20% a 100% de B em 55 à 60 minutos; e 100% a 0% de B em 60 à 65 minutos. A eluição dos peptídeos foi monitorada por meio de leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm. Para cada conjunto de misturas, coletaram-se 26 de frações de 500 µl, que foram agrupadas de acordo com separação dos picos intensidade foram agrupadas e foram secas em concentrador a vácuo tipo *speedvac* e ressuspendidas em Ácido Fórmico (AF) 0.1% para a aplicação no LC-MS/MS.

4.11 ANÁLISE VIA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

Cada fração ou mistura de frações foi analisada em três replicatas técnicas num sistema de nano cromatografia líquida (nLC) no instrumento Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado ao espectrômetros de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific), na análise qualitativa do estágio de 35 dias, e Q-Exactive Plus (Thermo Scientific), nas análises quantitativas. Foi utilizado o solvente A (H₂O 95% / ACN 5% / AF 0.1%) e o solvente B (H₂O 5% / ACN 95% / AF 0.1%) em todas as análises realizadas.

Na análise qualitativa, foi efetuado um gradiente de três horas: de 5% até 35% de B em 160 minutos; de 35% até 95% de B de 160 a 168 minutos e 95% de B 168 a 180 minutos. A ionização e transferência dos íons foi feita em fonte nano-electrospray (Thermo Scientific). Os parâmetros de operação do espectrômetro de massas foram aquisição de espectros no modo positivo por aquisição dependente de dados (DDA – do inglês, *data dependent acquisition*) com uma lista de exclusão dinâmica de 45 ms, voltagem no spray de 2.5 kV, e temperatura de 200°C no capilar aquecido. Varredura inicial do MS (*full scan*) em 60.000 FWHM de resolução para 400 m/z no analisador Orbitrap. Foram selecionados os dez íons mais intensos para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID - do inglês, *collision-induced dissociation*) com energia normalizada de 35s, janela de isolamento de m/z 2 e exclusão dinâmica de 45 s.

Nas análises quantitativas, foram efetuados gradientes de duas horas, para diferenciação de organoides saudáveis; e uma hora e meia, diferenciação de organoides com e sem ACC: de 5% até 35% de B em 160 minutos; de 35% até 95% de B de 160 a 168 minutos e 95% de B por 12 minutos. A ionização e transferência dos íons foi feita em fonte nano-ESI. O espectrômetro de massas operou com a aquisição de espectros no modo positivo por DDA, com uma lista de exclusão dinâmica de 30 ms, voltagem no spray de 2.5 kV, e temperatura de 200°C no capilar aquecido. *Full scan* ou MS1 na faixa de 375 – 1800 m/z, resolução de 70.000 (para m/z 200), fragmentação dos 10 íons mais intensos em célula de colisão HCD (*Higher-energy collisional dissociation*), com energia de colisão normalizada de 30 e resolução de 17.000 (para m/z 200) na aquisição dos espectros MS/MS. Janela de isolamento de m/z 2 e exclusão dinâmica de 45 s. Os cromatogramas e espectros foram visualizados pelo software Xcalibur v.2.1., nos quais foram verificados o perfil

cromatográfico e a reprodutibilidade entre as replicatas biológicas de cada de cada fração, em todas as análises.

4.12 BUSCA POR PROTEÍNAS BASEADA EM PSM

A análise de dados foi realizada com um conjunto de ferramentas disponíveis no programa Proteome discoverer 2.1 e 2.4 a partir dos arquivos dos espectros de massas experimentais (*.RAW files). O programa trabalha com mecanismos de busca, como o Sequest[™] HT (Thermo Fisher Scientific), para processar todos os dados coletados e a identificação dos peptídeos por combinação de espectro de peptídeos (*Peptide Spectrum Match* - PSM) contra a base de dados. Para a análises dos modelos neurais humanos, foram utilizados o banco de dados da espécie *Human* que foi obtida do repositório público *UniProt* ("UniProt: a worldwide hub of protein knowledge", 2019) e também foi acrescido o banco de dados de sequências dos contaminantes comuns em espectrometria de massas.

Na busca os seguintes critérios foram adotados: tolerância de massa do peptídeo de 10 ppm; tolerância de massa dos fragmentos de 0,5 Da nas análises feitas no Ltq orbtrap Velos e 0,1 Da nas análises feitas no Q-exactive plus; clivagem por tripsina total, com limite máximo de duas clivagens perdidas; modificações variáveis: oxidação da metionina (+ 15,995 Da), marcação, quando utilizada, iTRAQ 4plex (+ 144,102 Da em lisina, tirosina e extremidade N-terminal) e modificação fixa a carbamidometilação da cisteína (+ 57,021 Da). Foram utilizados parâmetros de filtro de classificação por Target Decoy PSM Validator e validados pela taxa de falsos positivos (FDR – do inglês *False Discovery Rate*).

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E DE ENRIQUECIMENTO DE GENES

As proteínas identificadas no passo anterior foram analisadas estatisticamente no programa Perseus 1.6.12.0. (TYANOVA et al., 2016). Os dados de quantificação são relacionados a intensidade dos canais do iTRAQ de cada grupo de análise e suas respectivas replicatas biológicas e técnicas foram obtidos através dos resultados do *Proteome Discoverer* 2.1 e 2.4. Esses dados foram processados nos programa Perseus 1.6.12.0. Na análise, os valores das intensidades de proteínas foram transformados no logaritmo na base 2 e normalizados com a subtração pela mediana.

Como critério de valores aceitáveis, em ambos os grupos, foi utilizado um filtro, em que somente proteínas em que estivesse com pelo menos dois valores válidos em pelo menos uma das condições marcadas, eram mantidas para quantificação. Para estabelecer uma quantificação relativa, foi realizado um teste estatístico de análise de variância unilateral (ANOVA) para comparar as condições descritas na tabela 1, com valores de confiabilidade de 95%, com diferença significativa para $p < 0,05$. A partir dos resultados obtidos, foram considerados para os valores com hipótese nula rejeitada resultante do teste estatístico. A partir desses resultados, foram realizados um pós-teste ANOVA, Teste de Tukey, com FDR $< 0,05$ e/ou análises de clusterização hierárquica, com métricas de distância euclidiana.

Para o estudo de funções e interação das proteínas identificadas nos modelos neurais humanos, as proteínas analisadas estatisticamente foram contrastadas com a base de dados de termos do *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al. 2000) disponível no site (<http://geneontology.org/>), REACTOME (JASSAL et al., 2019), disponível no site (<https://reactome.org/>) e KEGG (KANEHISA, 2000; KANEHISA, et al., 2017), disponível no site (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) utilizando as ferramentas como DAVID (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009), METASCAPE (ZHOU, Y. et al., 2019) e Enrichr para classificá-las em diferentes categorias funcionais de ontologia, por enriquecimento dos genes.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES EM NEUROESFERAS

5.1 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE NEUROESFERAS E ORGANOIDES CEREBRAIS

A cultura de neuroesferas e organoides cerebrais humanos utilizados neste projeto foi realizada em colaboração com o IDOR. Os modelos desenvolvidos nesta instituição são utilizados na modelagem da origem do SNC, como também como modelo para o estudo de distúrbios, anomalias e doenças neurais. Neste presente trabalho, são utilizados como alternativa para o estudo de vias, processos e proteínas que estão relacionadas com o desenvolvimento de neurônios e do SNC.

5.2 PROTEÔMICA DE NEUROESFERAS

O proteoma das neuroesferas humanas foi analisado quantitativamente em dois momentos. Após a formação das neuroesferas, o primeiro momento de manipulação para a mudança foi no terceiro dia, momento escolhido para iniciar o estudo da diferenciação da neuroesfera. Um tempo posterior, 10 dias após a diferenciação, foi um ponto relatado anteriormente para derivar neuroesferas que, após o plaqueamento, pois elas podem migrar e projetar axônios radialmente, eventualmente formando redes neurais funcionais (NAGESHAPPA et al., 2016).

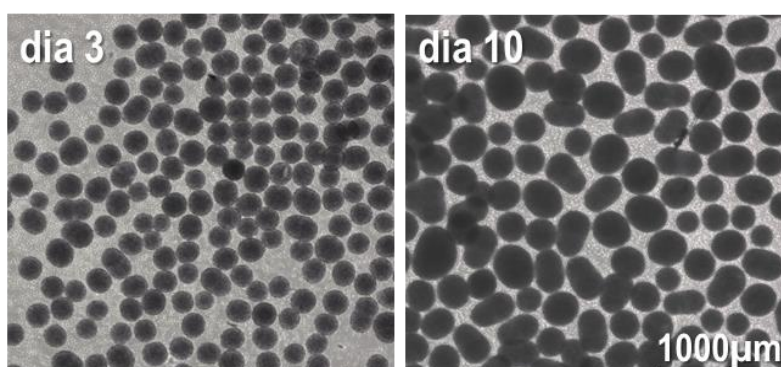


Figura 12 - Neuroesferas cultivadas por 3 dias e 10 dias.

Foram utilizadas duas replicatas biológicas de neuroesferas cultivadas por 3 dias e outras duas replicatas de células cultivadas por 10 dias, em meio suplementado com B27 e N2 (figura 12). As proteínas dessas condições foram digeridas e os peptídeos foram marcados com iTRAQ e misturados em uma relação 1:1:1:1 e fracionados off-line com HILIC. Esta etapa foi realizada por Murillo et al., (2017). Foram utilizados os dados brutos obtidos anteriormente e foram refeitas as análises

desses dados. Após análise no Proteome discoverer 2.4, foram identificados 6697 grupos de proteínas (proteínas com redundância na identificação) considerando um FDR de 1%.

5.2.1 Correlação das proteínas identificadas

A correlação do perfil de proteínas da neuroesfera com o perfil de proteínas do córtex fetal valida o uso de neuroesferas para estudar o encéfalo humano. Djuric et al. 2017, analisaram o desenvolvimento cerebral humano de maneira espaço-temporal, especificamente a VZ, a zona intermediária interveniente (IZ), a subplaca e o córtex cerebral frontal. Foram calculadas as correlações de *Pearson* de neuroesferas, a partir dos valores de PSM transformados para log2, comparado com dados proteômicos do córtex fetal de 16-41 semanas e do córtex adulto e os valores estão resumidos na figura 13 (DJURIC et al., 2017). A correlação é mais alta na semana embrionária 20 ($r = 0,52$) e mais baixa com o córtex adulto ($r = 0,34$), mostrando que o perfil molecular das neuroesferas é mais semelhante ao córtex humano nas primeiras semanas embrionárias.

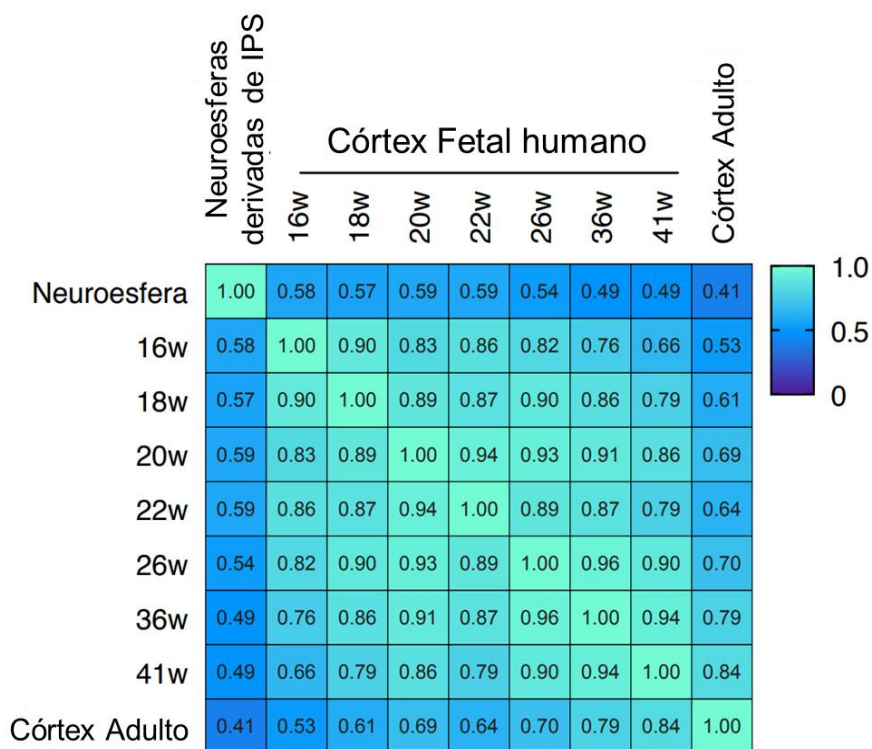


Figura 13 - Identificação de proteínas em neuroesferas que estão correlacionadas com proteínas do cortex fetal.

5.2.2 Análise proteômica quantitativa das neuroesferas

Para verificar o perfil das proteínas reguladas, foram consideradas diferencialmente expressas considerando um limite de 0,5 do log₂ fold change de 3 e 10 dias (10D / 3D) ou seja para as razões de iTRAQ (115/114 e 117/116) com valores $\geq 1,5$ ou $\leq 0,67$, no intervalo de confiança de 95% pelo teste t de Student (p significativo $< 0,05$). Proteínas diferencialmente reguladas foram representadas na figura 15-A em um gráfico do tipo *Vulcano plot*. De 3 a 10 dias de diferenciação da neuroesfera, um total de 433 proteínas foram reguladas negativamente e 479 foram reguladas positivamente.

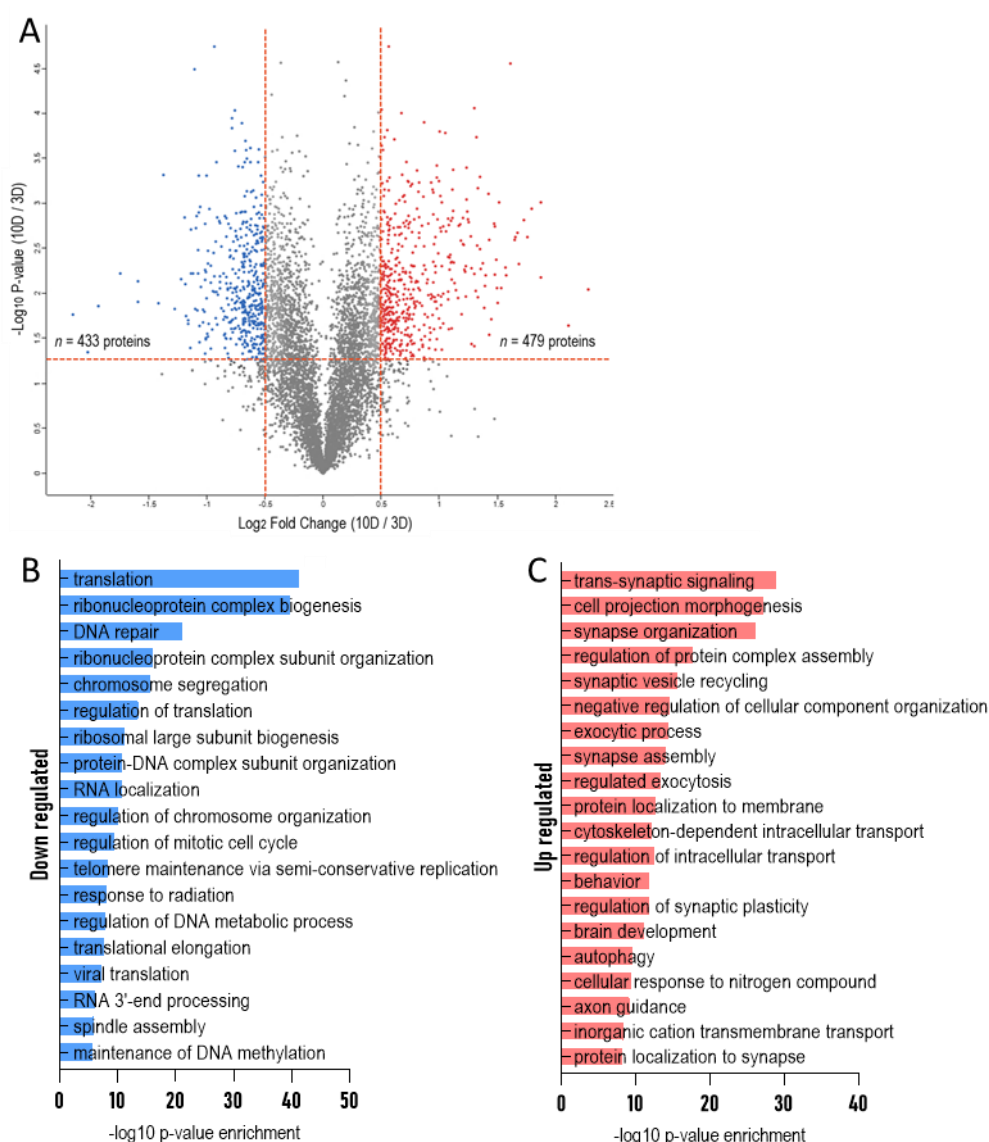


Figura 14 - Proteínas diferencialmente expressas e seus processos biológicos em termos de GO enriquecidos significativamente os entre 3 dias e 10 dias de diferenciação. A: Gráfico do vulcão exibindo variações significativas. O eixo vertical corresponde ao negativo do log valor p do teste t e o eixo horizontal exibe o valor $\log_2$ fold change. As proteínas foram consideradas reguladas positivamente e reguladas negativamente com os valores de fold change $\geq 1,5$ ou $\leq 0,67$ no valor-p $< 0,05$. B: Visão geral do enriquecimento de processos biológicos $[-\log_{10} (\text{valor p})]$ de genes com regulação negativa em um gráfico de barras. C: Visão geral do enriquecimento de processos biológicos $[-\log_{10} (\text{valor p})]$ de genes regulados positivamente em um gráfico de barras

Foram realizadas análise de enriquecimento de termos GO para processos biológicos das proteínas reguladas, e o resultado obtido foi resumido em forma de

gráfico de barras na figura 14-B, para processos negativamente regulados e 14-C para processos positivamente regulados. Esta análise revelou que as proteínas mais expressas em 10 dias estão relacionadas com processos de regulação da transcrição, regulação do metabolismo de DNA, reparo de DNA, ou seja, são proteínas relacionadas ao ciclo celular. Enquanto as proteínas reguladas positivamente estão relacionadas a processos como sinalização trans-sináptica, regulação da plasticidade sináptica, desenvolvimento do cérebro, orientação do axônio, ou seja, essas proteínas estão relacionadas à maturação neuronal.

Durante a diferenciação, as proteínas relacionadas à orientação dos axônios foram reguladas positivamente em neuroesferas de 10 dias. Das proteínas identificadas observa-se pelo esquema da figura 15, que das 96 proteínas na via de orientação do axônio (banco de dados KEGG), 42 foram identificadas em nosso conjunto de dados, dos quais 16 foram reguladas positivamente. Não há proteínas reguladas negativamente no conjunto de dados que estão relacionadas ao processo de orientação dos axônios. As proteínas reguladas na via de orientação do axônio fazem parte da sinalização de Netrina, Slit, Semaforinas, Netrina-G2 e moléculas de adesão celular (CAMs).

Figura 15 – Via completa da orientação do axônio. As proteínas relacionadas a esta via que foram identificadas nos dados são destacadas em azul e as proteínas reguladas, com aumento de abundância estão destacadas em vermelho. Os blocos em verde representam proteínas que não foram detectadas no conjunto de dados. Setas contínuas representam interação ou relação molecular direta. Setas pontilhadas representam efeito indireto ou mudança de estado. + p: fosforilação. -p: não fosforilado. Adaptado do banco de dados de vias do KEGG (KANEHISA, M., 2000).

Netrina-1 foi uma das proteínas identificadas em nosso conjunto de dados. Ela é uma proteína produzida pelo piso da placa neural e foi a primeira pista de orientação do axônio identificada na medula espinhal. A sinalização de Netrina pode promover o crescimento ou repulsão dos axônios, dependendo se dois genes que são seus receptores, UNC5A e DCC, são expressos nas células (JARJOUR et al., 2003; POWELL et al., 2008). Acreditava-se que Netrina-1 atraia os axônios comissurais por um gradiente com alta concentração na placa assoalho e também no canal central, do tubo neural (KENNEDY et al., 1994). Principalmente porque sua ausência prejudica gravemente a extensão do axônio comissural para a linha média (BIN et al., 2015; SERAFINI et al., 1996). No entanto, netrina-1 também é expresso por progenitores neurais na zona ventricular (VZ), sendo esta principal guia os axônios comissurais espinhais, fornecendo um substrato de crescimento de axônio para orientar sua extensão em direção à linha média ventral, de uma maneira dependente de DCC (DOMINICI et al., 2017; VARADARAJAN et al., 2017). A ligação ao DCC, isolada, promove o crescimento do axônio, mas a associação de UNC5A e DCC dispara a sinalização para repulsão (HONG, K. et al., 1999; KENNEDY et al., 1994).

Durante o desenvolvimento cerebral, a repulsão é necessária para guiar os axônios até seus alvos adequados. Por exemplo, as fendas são secretadas pela linha média, um revestimento de células gliais que separa os dois hemisférios cerebrais. Neurônios que expressam o receptor ROBO se afastam da linha média, enquanto os neurônios que expressam baixos níveis de ROBO podem cruzar a linha média. Depois de cruzar a linha média, os neurônios aumentam a expressão do ROBO, o que impede o retorno dos axônios ao seu hemisfério de origem (KIDD et al., 1998). As semaforinas também atuam como moléculas quimiorreflexivas quando se ligam aos receptores da plexina, em associação com a molécula de adesão de células neurais L1 (L1CAM) (BASHAW; KLEIN, 2010; DICKSON, 2002). O aumento da expressão de UNC5A, DCC, ROBO2 e Plexinas sugere que, durante a diferenciação, as neuroesferas adquirem a maquinaria molecular para responder às dicas de orientação dos axônios.

Diversos genes da via de orientação do axônio estão envolvidos em distúrbios neurológicos, causadas por mudanças na expressão ou função dessas proteínas que podem induzir mudanças patológicas nos circuitos neurais (VAN BATTUM; BRIGNANI; PASTERKAMP, 2015). Os genes de orientação do axônio identificados em nosso conjunto de dados foram contrastados com bancos de dados que mostram a relação de genes com diversas doenças, DISGENET (distúrbios neurodegenerativos

e neuropsiquiátricos) e ARCHS 4 (distúrbios do neurodesenvolvimento). A pesquisa foi realizada usando a ferramenta Enrichr (KULESHOV et al., 2016). Esta análise foi realizada para abordar o futuro potencial do uso de neuroesferas para explorar proteínas relacionadas à orientação do axônio que predisõem ou causam doenças que afetam o sistema nervoso humano. Na Tabela 1 mostra os genes de orientação do axônio identificados em neuroesferas com sobreposição significativa para distúrbios neurodegenerativos, neuropsiquiátricos e do neurodesenvolvimento.

Tabela 1 - Genes da via de orientação do axônio correlacionados com distúrbios neurológicos.

Transtorno neurológico	Genes
Neurodegenerativo	
Doença de Alzheimer	ITGB1; GSK3B; EPHA4; ROCK1; ROCK2; LRRC4; CXCR4; NTN1; RHOA; GNAI1; CDC42; PPP3CA; PPP3R1; CDK5; DPYSL2; CFL2; ABL1; MAPK1; FYN; RAC1; EPHB2; EPHB1; MAPK3; PLXNA3
Doença de Parkinson	GSK3B; ROCK2; CXCR4; CDC42; CDK5; RASA1; ABL1; MAPK1; FYN; RAC1; SRGAP3; EPHB2; EPHB1; MAPK3
Doença de Huntington	GSK3B; ROCK1; CDK5; DPYSL2; LIMK1; MAPK1; RAC1; EPHB2; EPHB1
Neuropsiquiátrico	
Esquizofrenia	GSK3B; DCC; NFATC3; CXCR4; L1CAM; EFNB2; CDC42; PPP3CA; PPP3CB; PPP3R1; CDK5; DPYSL2; CFL1; PLXNA2; MAPK1; FYN; RAC1; SRGAP3; EPHB2; PAK3; EPHB1; PAK2; MAPK3
Transtorno de Depressão maior	NRP1; GSK3B; CDK5; MAPK1; RAC1; EPHB2; EPHB1; MAPK3; PLXNA3
Transtorno Bipolar	GSK3B; PPP3CB; NRAS; DPYSL2; MAPK1; FYN; RAC1; EPHB2; MAPK3
Neurodesenvolvimento	
Agiria-paquigiria tipo 1	ROBO2; GSK3B; DPYSL5; DCC; DPYSL2; SRGAP3; PAK3; L1CAM; PAK5; ROBO1; PLXNA3
Disgenesia do corpo caloso, ligada ao X, recessiva	ROBO2; GSK3B; DPYSL5; DCC; DPYSL2; PLXNA1; PAK3; PAK5; ROBO1; PLXNA3
Macroqiria, paralisia pseudobulbar e retardo mental	ITGB1; GSK3B; ARHGEF12; DPYSL5; DPYSL2; PLXNA1; PAK3; L1CAM; ROBO1
Hipoplasia cerebelar	GSK3B; DPYSL5; DCC; PLXNA1; SRGAP3; L1CAM; ROBO1; PLXNA3
Heterotopia de banda familiar	GSK3B; ARHGEF12; DPYSL5; DPYSL2; PAK3; L1CAM; ROBO1
Síndrome de lissencefalia do tipo 1	GSK3B; ARHGEF12; DPYSL5; PLXNA1; PAK3; L1CAM; ROBO1

Esses genes podem ser divididos em receptores de membrana, efetores de sinalização e quinases. Seria promissor abordar se receptores da via de orientação do axônio são regulados ou mal localizados em modelos neurais para as doenças listadas na Tabela 1. Como por exemplo, a proteína L1CAM por estar altamente

enriquecida na superfície de axônios em desenvolvimento e em regeneração. L1CAM durante o desenvolvimento encefálico, é crítica em vários processos, incluindo migração neuronal, crescimento axonal e fasciculação e sinaptogênese. No cérebro maduro, a L1CAM desempenha um papel na dinâmica da estrutura e função neuronal, incluindo a plasticidade sináptica, e está envolvido na orientação, na ramificação e na mielinização axonal. O L1CAM é alterado em distúrbios do neurodesenvolvimento e pode ser regulado por disfunção dos circuitos cerebrais. Um estudo proteômico de proteínas nascentes em axônios *in vitro* demonstrou que L1CAM é traduzido em axônios, em resposta a netrina, semaforina e BDNF (CAGNETTA et al., 2018). Eles mostraram que a produção rápida de proteínas é relevante durante o crescimento axonal e que não pode ser estimada por análise transcriptômica (idem).

Além disso, as cascatas de sinalização desencadeadas por esses receptores poderiam ser estudadas a nível molecular em células humanas e servir como alvos de drogas para a remodelação dos circuitos cerebrais, com possível aplicação em doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas.

CAPÍTULO 6**RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES EM ORGANOIDES CEREBRAIS**

6.1 PROTEÔMICA DE ORGANOIDES CEREBRAIS

Foi realizada a análise proteômica da cultura dos organoides cerebrais que foram utilizados neste projeto, para verificar o seu potencial como modelo do desenvolvimento neuronal. A análise consistiu em obter via LC-MS/MS o proteoma total do organoide, do menor estágio de desenvolvimento, para caracterizá-lo por sua natureza qualitativa, como informações sobre a estrutura do organoide diferenciado, as interações proteicas e as suas principais funções celulares.

Os organoides possuem uma alta complexidade celular e, após o processamento e obtenção dos peptídeos originados pela digestão trípica das proteínas, foi realizado o pré-fracionamento com coluna HILIC de organoides com 35 dias de desenvolvimento. A figura 16 ilustra as frações obtidas deste fracionamento. Para a análise via LC-MS/MS foram utilizadas 13 frações, em que 10 corresponderam a frações individuais (0 a 2 e 12 a 18) e as outras três compreendem um *pool* de frações com baixa intensidade na cromatografia (3-11, 19-20 e 21-25).

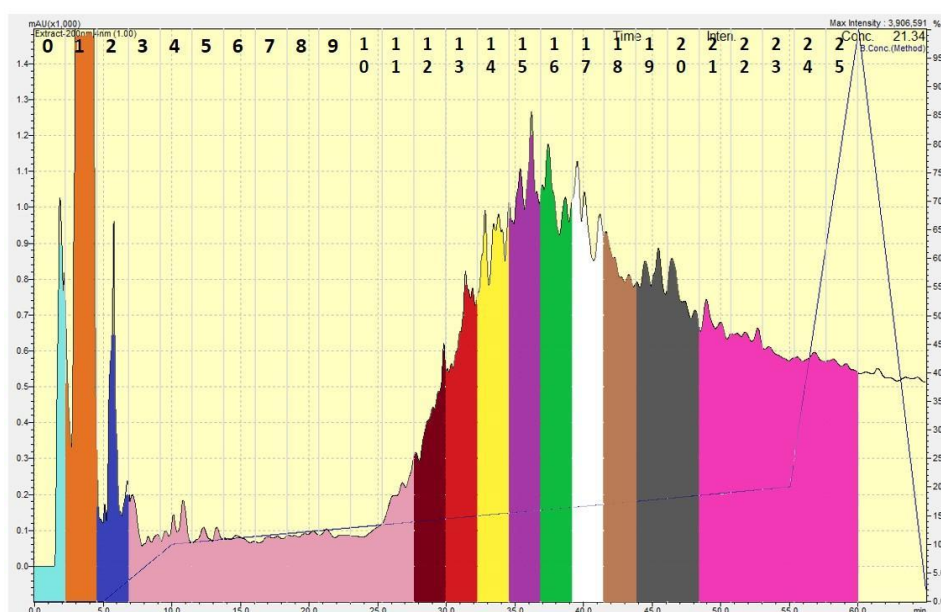


Figura 16 - Cromatograma obtido pelo fracionamento HILIC. Cada cor corresponde a uma fração analisada por LC-MS/MS.

Os dados gerados pós análise via LC-MS/MS das frações foram processados juntamente no software Proteome Discoverer. Em números, foram identificadas 4.099 proteínas de característica *Master* (grupos de proteínas com redundância de

identificação), 14.993 peptídeos, desses 13.834 são peptídeos únicos e foram determinados 63.580 PSMs.

6.1.1 Perfil de proteínas identificadas

As 100 proteínas mais abundantes, utilizando como parâmetro a relação de PSMs, foram analisadas por enriquecimento de genes no programa on-line DAVID (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009) para verificar as principais características fenotípicas desses organoides. Os termos mais enriquecidos foram resumidos na figura 17.

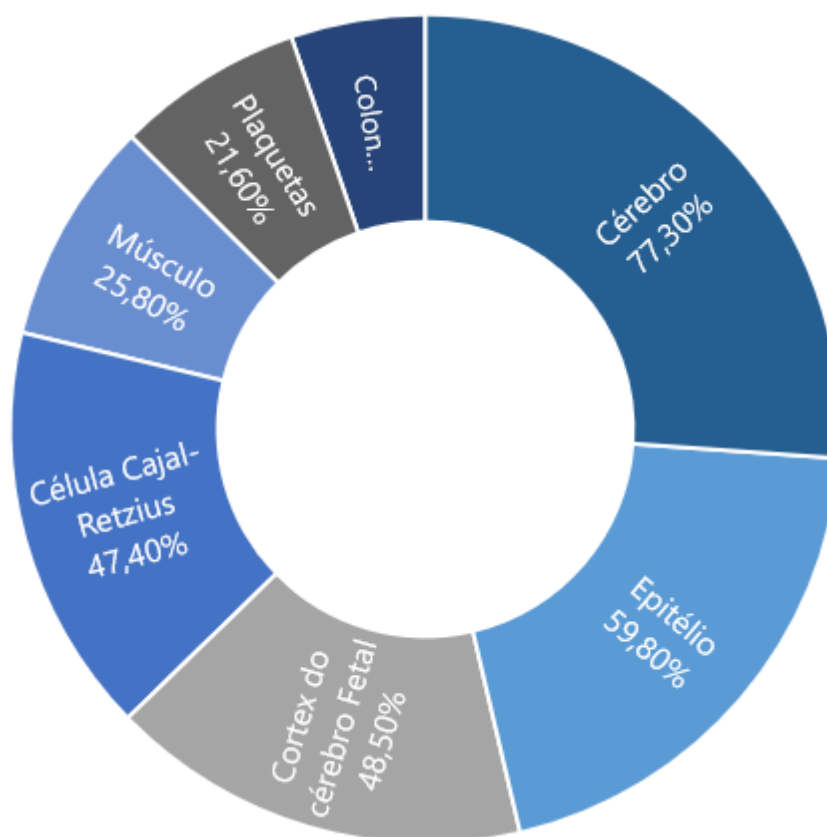


Figura 17 - Gráfico relacionando regiões teciduais e os genes das proteínas mais abundantes, em porcentagem de genes.

A análise de enriquecimento de um conjunto de proteínas é um método para identificar classes de genes que estão super-representadas quando comparadas a um grande conjunto de genes, como o genoma. Tais dados foram enriquecidos em termos '*Tissue_Expression*' e a maioria (76,6%) das proteínas identificadas correspondeu as partes cerebrais. Além disso, algumas regiões cerebrais relacionadas ao

desenvolvimento cerebral embrionário foram identificadas com um alto enriquecimento dos genes correspondente a esse grupo de proteínas (figura 17).

Em torno de 47,4% dos genes estão relacionados a célula de Cajal-Retzius, com um grande enriquecimento em relação ao genoma completo (valor $p = 1,90.10^{-61}$). Esse tipo celular representa um neurônio transitório que é a principal fonte de Reelin, uma grande glicoproteína da matriz extracelular, que ajuda a regular os processos de migração e posicionamento neuronal, na zona marginal do neocórtex e hipocampo em desenvolvimento. Outra região embrionária que corrobora com o enriquecimento anterior é o córtex fetal (valor $p = 4,8.10^{-60}$) pois, durante desenvolvimento inicial dessa região, há a presença de células Cajal-Retzius atuando como os primeiros neurônios desenvolvidos (MARÃ-N-PADILLA, 2015; MEYER; GONZÁLEZ-GÓMEZ, 2018).

Em nossa análise foram identificadas também proteínas que são marcadores de regiões do SNC embrionário como o mesencéfalo, o prosencéfalo e o rombencéfalo. Essas regiões posteriormente se diferenciarão em novas regiões cerebrais que compreenderão a região do encéfalo. Uma dessas é a proteína homeobox, um fator de transcrição que é necessário para especificação e regionalização de partes do sistema nervoso central durante o desenvolvimento inicial (FRANTZ et al., 1994; SIMEONE, 1998). O Otx2 tem um papel regulatório e controla diferencialmente o surgimento dos subdomínios dorsais do progenitor mesencefálico, sendo um dos principais determinantes genéticos desse processo. A perda de Otx2 gera modificações tanto na identidade e quanto no destino de progenitores, o que faz o Otx2 ser necessário em vários níveis nesses processos de formação do mesencéfalo (DI GIOVANNANTONIO et al., 2014; PUELLES, 2004).

Foi identificado também o BCL11B, também conhecido como CTIP2, que é um fator de transcrição do tipo “*Zinc Finger protein*”, fundamental no desenvolvimento fetal, com papéis importantes para a diferenciação e no desenvolvimento de vários subtipos neuronais. Sua expressão foi identificada nas camadas IV/V do córtex, sistema límbico, bulbo olfativo, gânglios da base e regiões CA1/2 do hipocampo durante o desenvolvimento embrionário de murinos e essa expressão foi mantida no córtex, hipocampo e gânglios da base até a idade adulta (LEID et al., 2004). O Bcl11b é altamente expresso no hipocampo por células granulares pós-mitóticas no giro dentado em desenvolvimento e no adulto. Ele é necessário para o desenvolvimento estrutural e funcional do giro dentado assim como para sustentar a integridade

estrutural e funcional do hipocampo adulto (SIMON, R. et al., 2016; SIMON, Ruth et al., 2012; SIMON, Ruth; WIEGREFFE; BRITSCH, 2020). Possui também papéis críticos na diferenciação e regulação do desenvolvimento de neurônios espinhosos médios estriados, portanto é fundamental a sua expressão para o estabelecimento da arquitetura celular do estriado (ARLOTTA et al., 2008). BCL11B/CTIP2 é encontrado no sistema vomeronasal, que funciona e desenvolve suas funções durante o desenvolvimento do embrião em humanos. A proteína é expressa principalmente em células em proliferação e/ou neurônios imaturos com papel crítico no desenvolvimento adequado desse sistema em formação, diminuindo sua expressão após a embriogênese (ENOMOTO et al., 2011). Frequentemente é usado como um marcador para células neuronais do córtex pois, Bcl11b está presente extensivamente nos interneurônios GABAérgicos do córtex somatossensorial e em neurônios de projeção corticospinal (ARLOTTA et al., 2008; LENNON et al., 2017; NIKOUEI; MUÑOZ-MANCHADO; HJERLING-LEFFLER, 2016).

Outras proteínas que são marcadores da região do prosencéfalo foram identificadas, como DBI, CLU e SPARC. O DBI, inibidor de ligação ao Diazepam, também denominada como proteína de ligação à acil-CoA (ACBP), está presente em várias áreas do encéfalo, e atua na regulação da atividade dos receptores GABA_A. (CHRISTIAN et al., 2013; TONON et al., 2020; UJJAINWALA et al., 2019) possui a seus genes expressos diferencialmente na zona ventricular do neocórtex embrionário (VIED et al., 2014). Também é expresso na SVZ, sendo um modulador positivo da neurogênese pós-natal da SVZ por estimular a proliferação de células progenitoras desta região (ALFONSO et al., 2012).

A Clusterina (CLU) é uma glicoproteína com distribuição e funções variadas em diversos tecidos. Ela interage com uma ampla gama de moléculas e, portanto, possui papéis multifuncionais numa célula, mas geralmente é expressa em resposta ao estresse térmico, oxidativo ou mecânico na célula (JONES, S., 2002). Ela é produzida em neurônios e, mais abundantemente, em astrócitos e pode sofrer regulação positiva sob várias condições neuropatológicas, nas quais ocorre morte ou proliferação celular anormal (DAS GUPTA et al., 2019; FOSTER et al., 2019; HERRING et al., 2019; ROHNE; PROCHNOW; KOCH-BRANDT, 2016). Apesar da sua associação à neurodegeneração, a expressão de clusterina já está presente na vida fetal, em astrócitos corticais, hipocampais e em neurônios motores durante os estágios iniciais do desenvolvimento do SNC (CHARNAY et al., 2008).

A proteína SPARC / osteonectina é altamente expressa por glia radial, astrócitos e vasos sanguíneos em formação durante o desenvolvimento do SNC, podendo desempenhar um papel importante na regulação do desenvolvimento da sinapse excitatória, na neurogênese, na angiogênese, na modulação da migração celular e em processos regeneração e reparação neural (ALKABIE et al., 2016; JONES, E. V. et al., 2011; JONES, Emma V. et al., 2018; JONES, Emma V.; BOUVIER, 2014; LLOYD-BURTON; ROSKAMS, 2012; VINCENT; LAU; ROSKAMS, 2008). No cérebro maduro, sua expressão é comum em micróglias e em barreiras cerebrais, tornando-se abundante no córtex, no hipocampo e em substância cinzenta da medula espinhal (LLOYD-BURTON; ROSKAMS, 2012; VINCENT; LAU; ROSKAMS, 2008). Ela também é utilizada como padrão de modulação da sinaptogênese, por antagonizar esse processo (KUCUKDERELI et al., 2011; MOREL et al., 2017)

Os genes Hox são fundamentais na atribuição de identidade segmentar no encéfalo posterior em desenvolvimento e a especificidade é imposta pela expressão diferencial desses genes (GAVALAS, 2003). Em nossas análises identificamos a proteína Homeobox Hox-A1 (HOXA1) que é expressa no mesoderma recém-formado e no neuroectoderma (sobrepostos, formam o precursor do tronco cerebral) e possui importantes funções na especificação da crista neural, no padrão do encéfalo posterior e no desenvolvimento do coração e do ouvido (DE KUMAR, B. et al., 2017; MAKKI; CAPECCHI, 2010, 2011). Sendo a HOXA1 essencial para desenvolvimento adequado de vários tecidos embrionários.

Também foram identificadas proteínas importantes no processo sináptico, como sinaptotagmina, um sensor de Ca^{2+} que medeia a exocitose da vesícula sináptica (VS), desencadeando a liberação de neurotransmissores em neurônios (SÜDHOF, 2014); A sinaptobrevina (Syp - também conhecidas como VAMP), uma proteína abundante na VS, que em conjunto com outras duas proteínas, a sintaxe 1 e o SNAP-25, formam o complexo SNARE, um sistema que impulsiona na fusão da membrana vesicular durante a sinapse neuronal, sendo a Syp fundamental na montagem desse sistema (JAHN; FASSHAUER, 2012; LAKOMEK et al., 2019); a sinaptojanina, uma enzima lipídica que no processo sináptico interage com uma outra enzima, a endofilina, e ambas são necessárias para que um mecanismo de reciclar e formar as VS, por endocitose, funcione de forma ultra-rápida (SONG; ZINSMAIER, 2003; WATANABE et al., 2018); e receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA), que irá

transportar esse neurotransmissor do citoplasma do terminal pré-sináptico para fora da membrana da VS (SÜDHOF, 2014). Além disso, proteínas de células relacionadas a regiões da retina também foram identificadas: células da retina – marcador geral (GS), Muller glia (DKK3), fotorreceptores (RCVRN) e células ganglionares da retina (NEFL).

6.1.2 Análise proteômica quantitativa de organoides cerebrais

Nessa etapa do estudo, foram utilizados de quatro estágios com tempos de diferenciação diferentes dos organoides cerebrais, utilizando a estratégia de quantificação iTRAQ. De acordo com o esquema descrito na figura 11-B do capítulo 4, foram utilizados pools de organoides cultivados por 35, 45, 60 e 75 dias. As proteínas dessas condições passaram por digestão triptica e os peptídeos resultantes foram marcados com iTRAQ 4-plex e misturados na mesma razão. A mistura de peptídeos foi fracionada off-line em um HPLC com uma coluna HILIC em 25 frações. O perfil cromatográfico está descrito na figura 18

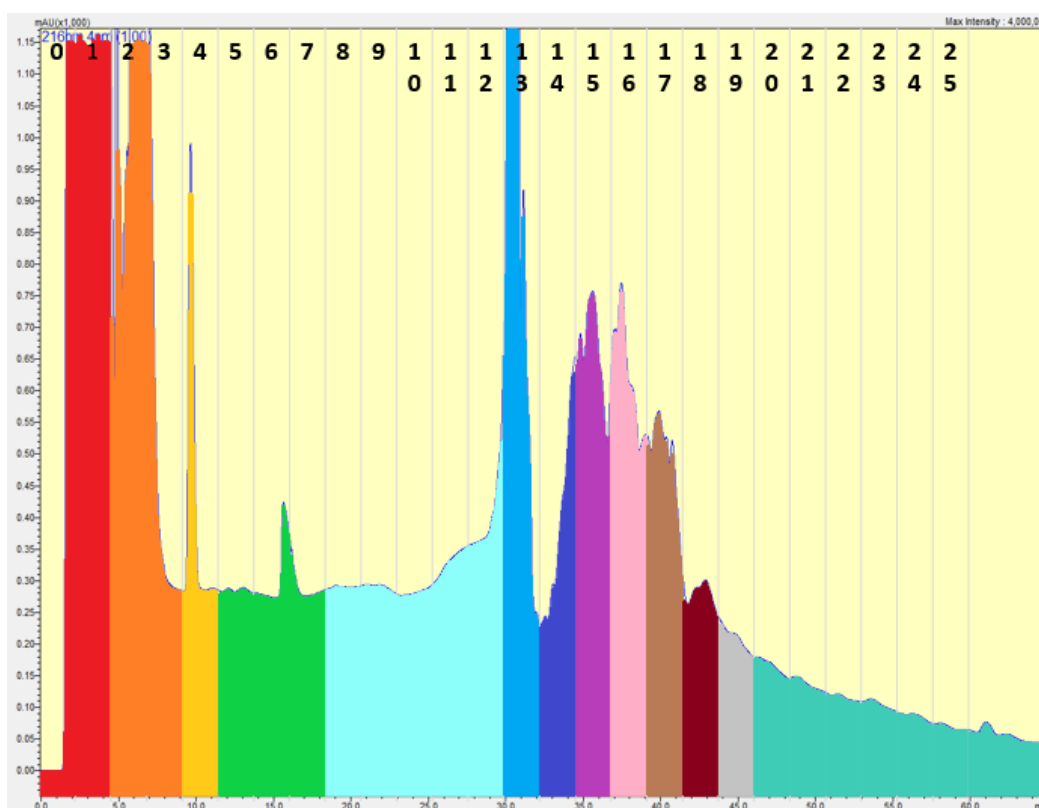
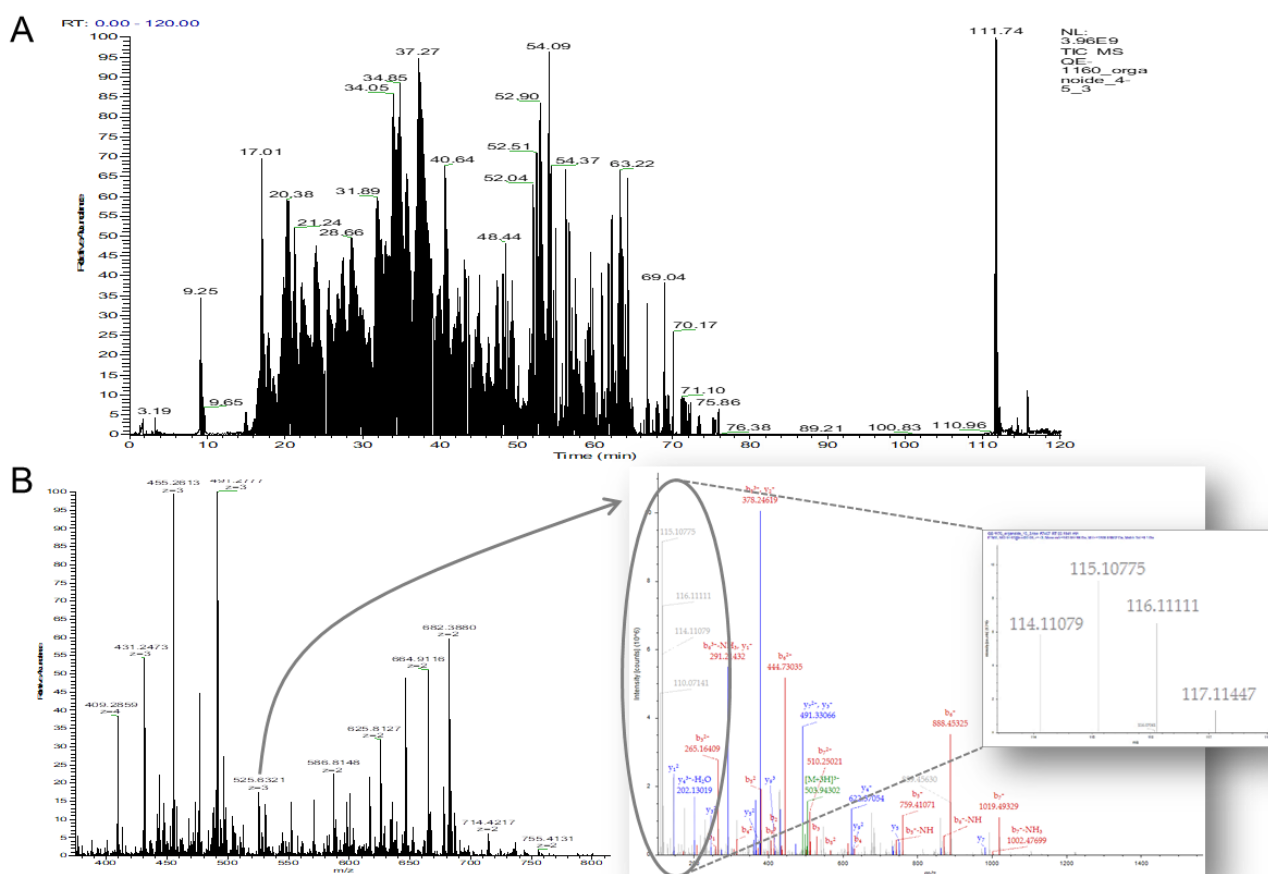


Figura 18 - Cromatograma obtido pelo fracionamento HILIC. Cada cor corresponde a uma fração ou pool de frações analisadas via LC-MS/MS.

Para a análise via LC-MS/MS no Q-exactive Plus foram utilizadas 13 frações e pool de frações, em que oito corresponderam a frações individuais (4 e de 13 a 18) e as outras cinco compreenderam a um pool de frações na cromatografia (0-2, 2-3, 5-7, 8-12 e 18-25). Cada fração foi analisada, em triplicata e, posteriormente, os dados gerados dessa análise foram processados em conjunto no Proteome discoverer.

Foram identificadas 5407 proteínas de característica *Master*, grupos de proteínas com redundância de identificação, 28.197 peptídeos, desses 27.436 são peptídeos únicos e foram determinados 118.749 PSMs. Os íons repórteres do iTRAQ foram usados para identificar e quantificar relativamente os peptídeos marcados e as proteínas correspondentes dos estágios de diferenciação, conforme o exemplo na figura 19, de um íon fragmentado obtido em uma das frações analisadas.



Entre os diferentes tempos de diferenciação, não foram observadas diferenças significativas em termos de identificação de proteínas. A sobreposição de proteínas identificadas já era esperada, devido a existência de íons co-eluídos e co-fragmentados junto aos íons repórteres do iTRAQ na análise LC-MS/MS. Para verificar as diferenças entre os estágios, será explorado principalmente os resultados quantitativos do iTRAQ, visto que estes apresentam maior confiabilidade e precisão quanto a abundância relativa das proteínas nas amostras. Para estas análises, foi realizado previamente a padronização das abundâncias dos canais do iTRAQ, relativa as proteínas identificadas, resumidas na figura 20.

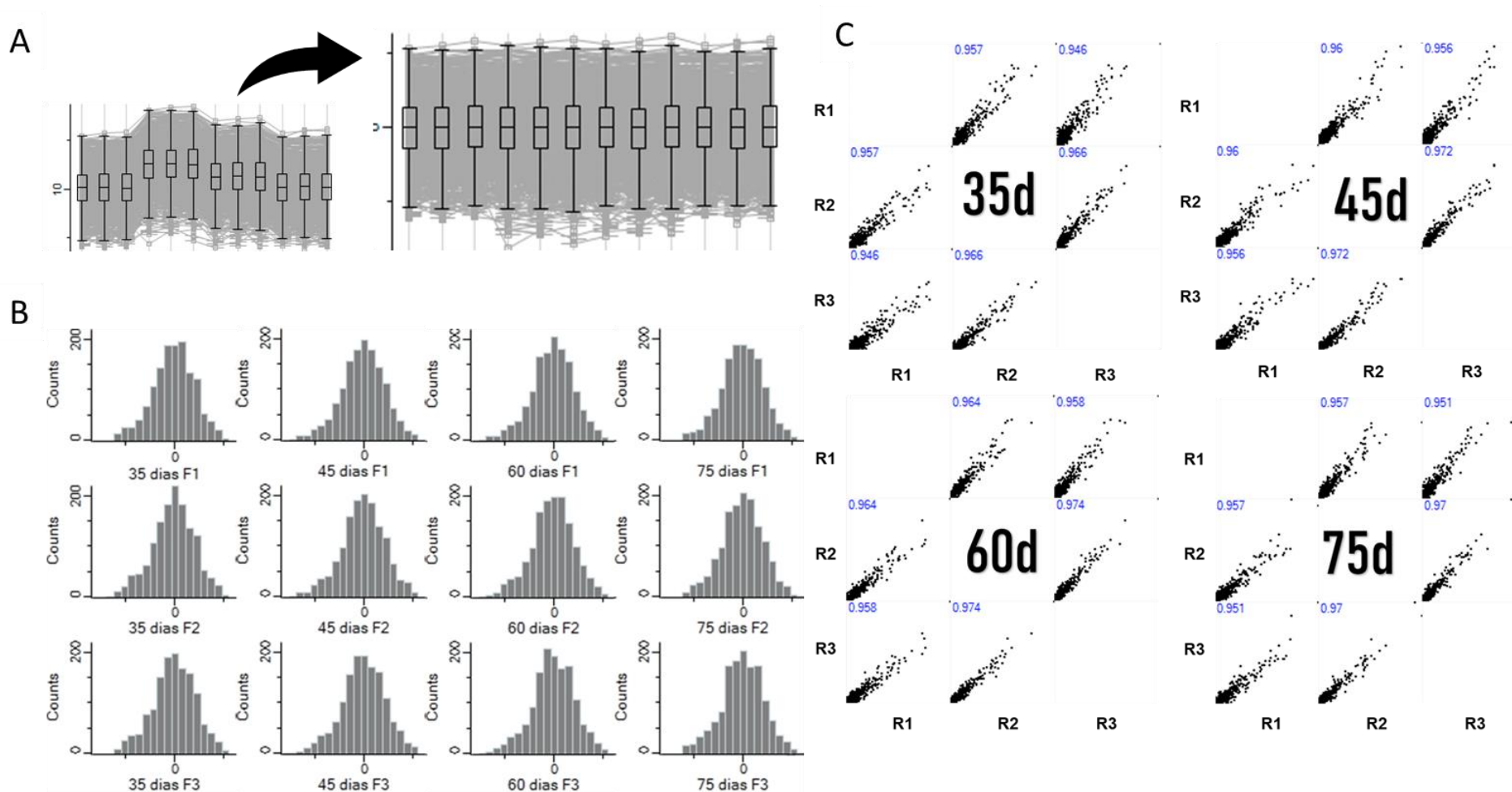


Figura 20 – Qualidade dos dados proteômicos. A: Gráficos de linha e box-plots mostrando antes e depois da normalização dos valores brutos de abundância dos canais do iTRAQ após análise no PD dos dados obtidos via LC-MS/MS. B: Histograma correspondente à normalização dos dados. C: Coeficiente de correlação de Pearson entre as replicatas técnicas de cada amostra.

Para comparar cada estágio de desenvolvimento e verificar as diferenças entre os diferentes tempos de diferenciação, foi realizada uma análise não-paramétrica de componente principal (PCA), figura 21, onde é possível visualizar as observáveis em um mapa bidimensional o quão separados estão os grupos. Observa-se um maior distanciamento do menor estágio (35 dias) em relação aos demais estágios, sugerindo que ele seja o mais diferente, o que nos faz supor que ocorra menor diferenciação neural destes organoides, quando comparado aos demais estágios. Apesar de ser menor a diferença de tempo (10 dias) entre os estágios de 35 dias e 45 dias, há uma maior diferença entre eles, indicando que possivelmente há maior diferenciação a partir do estágio de 45 dias. Entre os demais tempos de diferenciação (45, 60 e 75 dias) observa-se uma distância semelhante e gradual entre os estágios.

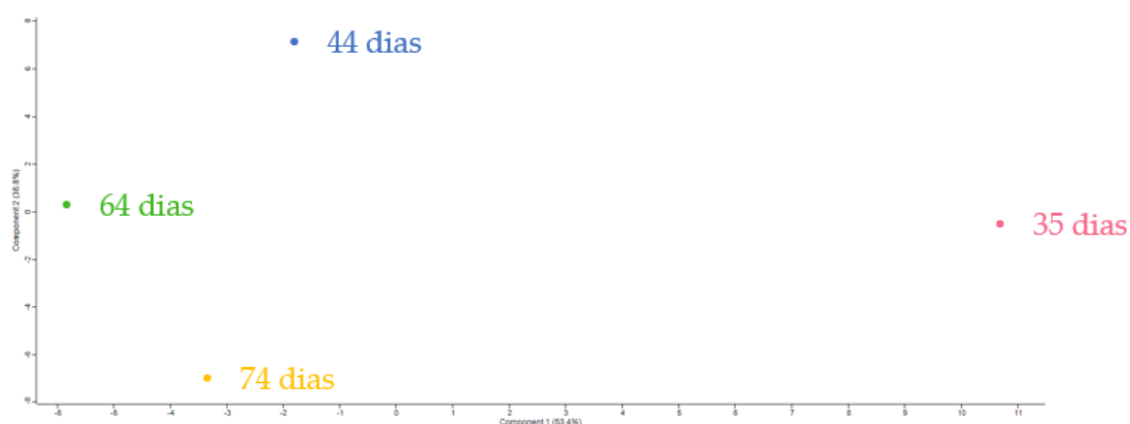


Figura 21 - Gráfico PCA representando os quatro estágios de diferenciação dos organoides (35 dias em vermelho; 45 dias em azul; 60 dias, em verde; 75 dias, em amarelo).

6.1.2.1 Proteínas diferenciais do desenvolvimento

A análise quantitativa das proteínas foi realizada utilizando teste estatístico ANOVA ($p < 0,05$) e resultou em 257 proteínas diferencialmente expressas entre os estágios de desenvolvimento. Para verificar o as diferenças dos organoides pelas proteínas com reguladas, foram definidos grupos dessas proteínas diferenciais com a mesmo comportamento, de acordo com a diferenciação ao longo do tempo. Para isso, análises de clusterização hierárquica foram realizadas e através delas proteínas com mesma tendência de expressão foram definidas (figura 22 e tabela 2)

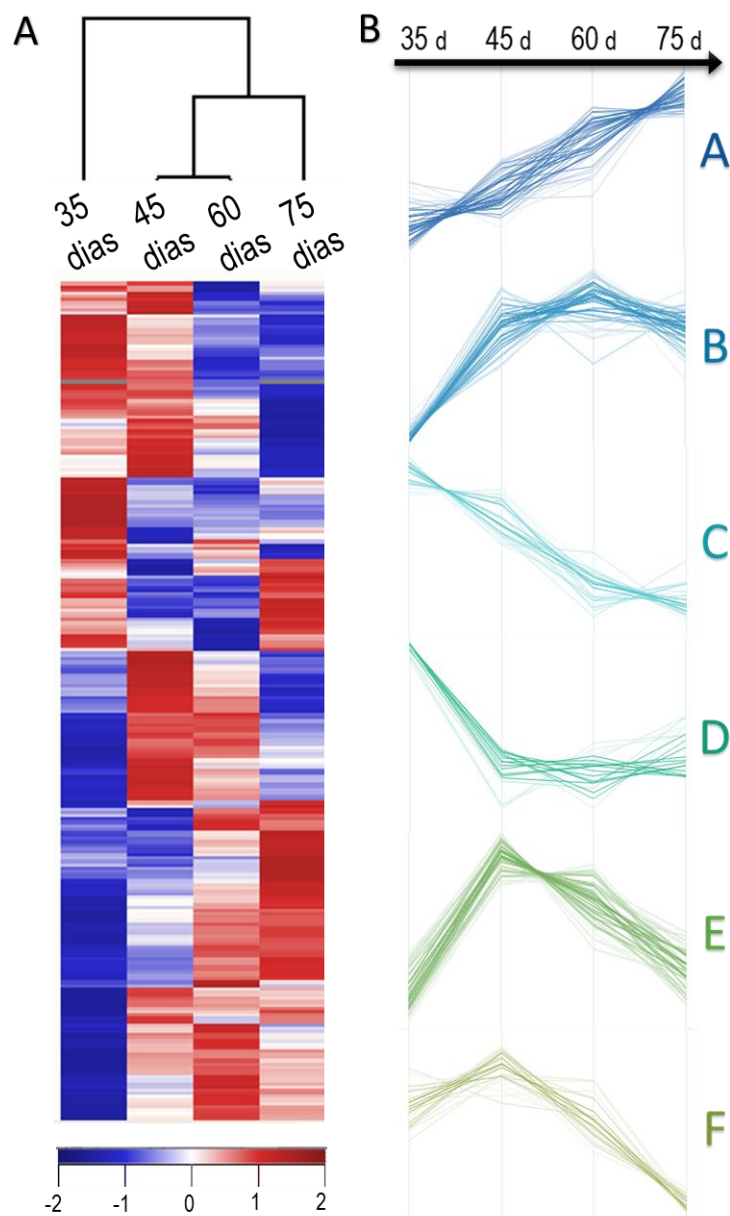


Figura 22 - Proteínas diferencialmente reguladas entre os estágios de diferenciação. A: Mapeamento das proteínas diferenciais por diferença de expressão (Heatmap) B: Gráficos de linhas de grupos de proteínas com mesma tendência na diferença de expressão.

Tabela 2 - Genes diferenciais correspondentes às linhas de tendências da diferenciação dos organoides (continua)

A	B	C	D	E	F
NCSTN	CSTB	PQBP1	SCAMP1	TXN	PDIA6
ACTR1B	PCBD1	TBCA	CBX5	HMGB2	CRABP1
PCSK1N	FH	HDGF	JPT2	SNRPB2	PCNP
DCX	PAFAH1B3	TPM4	RBM14	EIF5	SEPTIN2
GANAB	SUCLG1	OXR1	WASHC3	CAST	PDIA4
FABP7	PHB2	PGM5	NASP	MIF	DCXR
LGALS3	CLIC6	PRDX2	BCL2L2	CSRP2	ECHDC1
NAGK	CRYAB	CNPY4	MCM2	RPL23	AKR7A2
SRI	UCHL1	PSMD4	RPSA	TRH	PRDX1
SRR	TAGLN2	PDCD5	ILF2	RPS13	SUGT1
LAMP2	ALDOC	ST13	U2AF2	RBM8A	FKBP4
SGSH	CALB2	RAN	TARDBP	YWHAZ	MAP1LC3B2
MYLPF	GOT2	HSPH1	SET	EEF1A1	ABI2
MYL1	MAP1B	STIP1	PLS3	YWHAQ	SRRM2
ACTC1	TMSB4X	HNRNPH3	CRABP2	TUBA4A	RBM14
PBXIP1	OPHN1	MDH2	DDAH2	CDK5RAP3	PCBP1
INA	PRDX3	LDHB	ARFGAP1	AFP	PABPC1
ANXA6	ELAVL3	CCT2	NCOA5	TUBAL3	CNPY3
DPYSL3	MAOA	HSP90AA1	PTBP1	EEF2	SRSF3
PLEC	PDLIM3	HNRNPL	HNRNPA3		AK2
RBP1	HDHD3	TRIM67	DNAJC17		HNRNPH1
LMNA	PGAM1	ECI1	CPSF6		ELAVL1
CAPS	TPPP	MVD	HNRNPK		HSPA1B
RUFY3	CA2	PFN2	KHSRP		HNRNPA2B1

ADD2	ACADVL	PDHB	IGF2BP1
MT3	SOD1	ECH1	GAPDH
APOO	ATP5F1A	ETFA	
GNS	EPB41L1	EPB41L3	
TPD52L1	MDH1	TKT	
EEF1A2	SLC25A3	UQCRB	
SEPTIN3	CLTC	TPP1	
CRMP1	GOT1	GET3	
VDAC2	TUBB6	ATP5F1B	
BCAP31	ATP5ME	WBP2	
TUBB3	ARF3	H2BC18	
SOD2	TTR	ENO1	
UQCRQ	CLU	ERP29	
ANXA4	AIFM1	HSPA8	
TUBB4A	GDI1	TPPP3	
ATP5F1C	UQCRC2	HSPA9	
RTN4	TUBB2B	RPS7	
ARL8A		PFN1	
GNAO1		SHTN1	
PGRMC2		HSPB1	
SPTBN1		FAM157C	
TUBB2A		HSPD1	

Para uma interpretação funcional desses grupos de proteínas com a mesma característica diferencial, foram realizadas análises por enriquecimento de genes, contrastando os conjuntos de genes com as bases de dados do GO, para processos biológicos e do REACTOME, para vias, na ferramenta online metascape.

Os grupos de proteínas A e B tendem a aumentar a expressão ao longo do desenvolvimento. Processos e vias biológicas de maior enriquecimento desses dois grupos estão descritas na figura 23, em forma de gráfico de barras. No grupo A, observa-se a expressão dessas proteínas crescente com o tempo de diferenciação, com regulação positiva nos dois estágios mais maduros. Como resultado, vias e processos com maior complexidade e especificidade neuronal estão mais enriquecidos. A via de maior enriquecimento em relação a essa classe de genes é a regulação negativa da organização celular, indicando que ao longo do amadurecimento dessa cultura de organoides, há a redução de processos envolvidos na formação e arranjo de estruturas celulares.

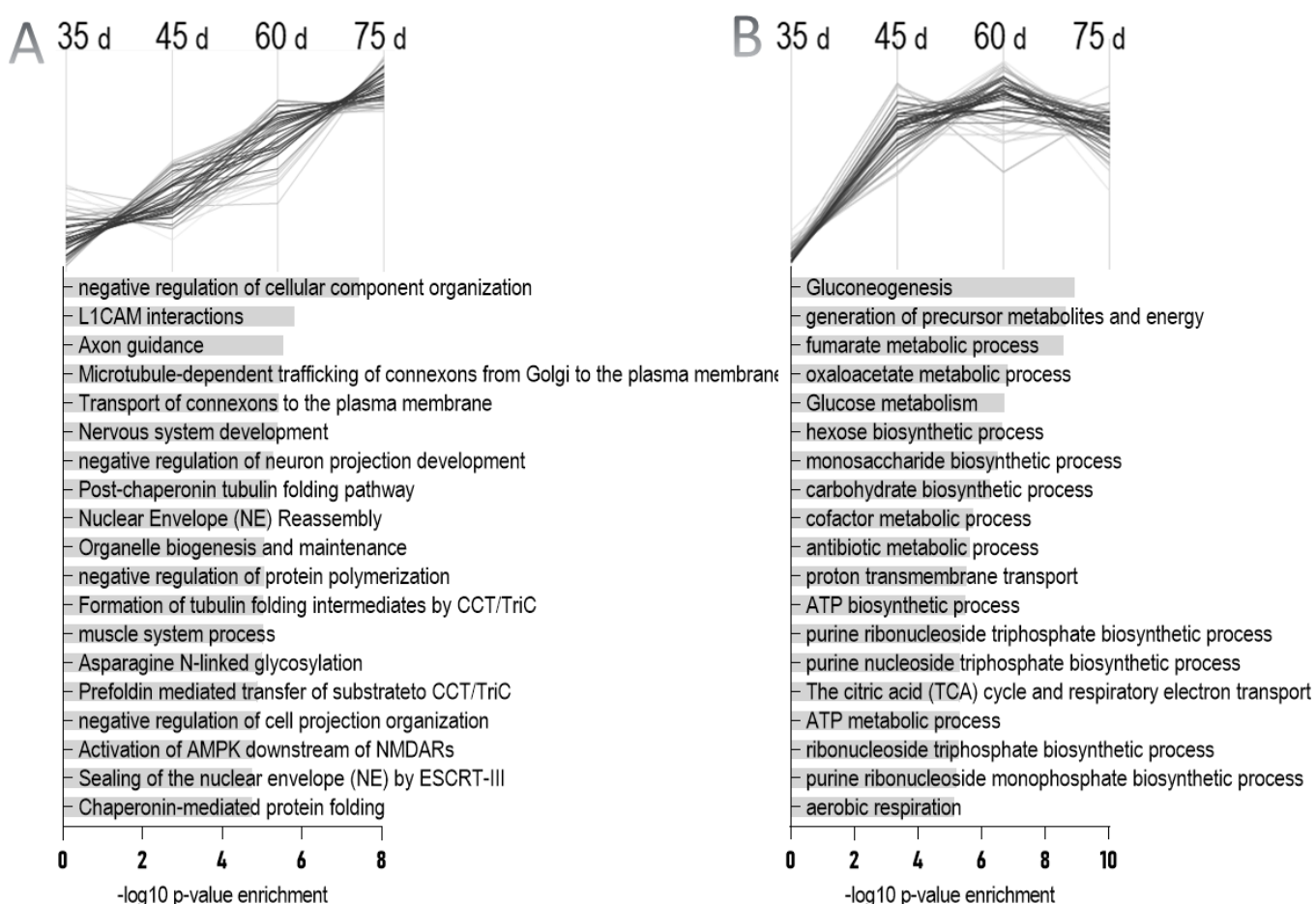


Figura 23 - Termos GO e reactome $[-\log_{10}(\text{valor } p)]$ significativamente enriquecidos em forma de gráfico de barras dos grupos A e B com mesma tendência de expressão.

Subsequente, vias relacionadas a formação do sistema nervoso estão enriquecidas, como a via de orientação do axônio e a via de interações da família L1

de moléculas de adesão de células neurais, conhecidas como L1CAMs. Essa família é constituída por quatro proteínas transmembrana da superfamília das imunoglobulinas, atuam como co-receptores e estão implicadas em processos essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso (SCHMID, R. S.; MANESS, 2008). Essas moléculas têm papéis críticos no crescimento e orientação dos axônios, na migração e sobrevivência neuronal, na plasticidade sináptica e na regeneração após algum trauma (MANESS; SCHACHNER, 2007). Muitas das funções das CAMs são realizadas por meio de interações homofílicas e heterofílicas com outros receptores da superfície celular (MANESS; SCHACHNER, 2007; SCHMID, R. S.; MANESS, 2008).

As proteínas do grupo A que estão relacionadas a essas vias e processos biológicos são cruciais no SN em desenvolvimento. Duas proteínas da família de proteínas mediadoras da resposta à colapsina, CRMP1 e CRMP4, estão entre elas. Essa família de proteínas, que são predominantes do SNC em formação, regulam o desenvolvimento neuronal e a plasticidade ao mudar seu estado de fosforilação (YAMASHITA; GOSHIMA, 2012). A CRMP1 é uma fosfoproteína que está relacionada na orientação do axônio, na maturação de sinapses, a regulação da migração celular e até mesmo em funções cerebrais adulta (NAKAMURA; OHSHIMA; GOSHIMA, 2020). CRMP1 também está envolvida na sinalização de Reelin, para regular a migração neuronal no córtex cerebral (YAMASHITA et al., 2006). Reelin é uma proteína importante no desenvolvimento inicial, como já discutido no tópico 5.2, e é implicada em diversas doenças cerebrais, quando está presente em níveis desregulados.

A CRMP4 é uma fosfoproteína citosólica com efeitos inibitórios do crescimento de neurites da mielina e do crescimento excessivo do axônio (ALABED et al., 2007, 2010), da ativação, migração e capacidade fagocítica da micróglia, consequentemente, reduzindo a neuroinflamação (MANIVANNAN et al., 2013). Foi demonstrado que CRMP4 é expressa em neurônios imaturos no cérebro em desenvolvimento e também em adultos, mas é expressa na zona subgranular do giro dentado e na SVZ bulbo olfatório, regiões de neurogênese adulta ou migração neuronal, sem ter expressão em outras regiões sem essas características (TSUTIYA; OHTANI-KANEKO, 2012). Estudos mostraram que deficiência da função reguladora de CRMP4 pode ter relações com características dos transtornos do espectro do autismo (TSUTIYA et al., 2017). Os organoides cerebrais diretamente de pacientes

podem ser uma alternativa viável para estudar e elucidar a relação dessa proteína com o transtorno de autismo.

Outro gene diferencial envolvido nessas funções é o DCX, que codifica a proteína de ligação aos microtúbulos *doublecortin*, também conhecida como doublin. DCX é uma proteína específica do SN, expressa nos neurônios em migração, sendo uma proteína essencial para a neurogênese durante o desenvolvimento do SN, no cérebro pré-natal e nas duas áreas neurogênicas do cérebro adulto. (BROWN et al., 2003; GLEESON et al., 1999). A DCX também foi relatada como crucial na proliferação de células progenitoras durante a neurogênese em cérebros embrionários (AYANLAJA et al., 2017).

A regulação do desenvolvimento da projeção neuronal apesar de ser negativa, é de suma importância durante a formação cerebral. Proteínas encontradas nessa via como a NOGO e RUFY3 são importantes inibidores de crescimento e alongamento axonal. A proteína diferencial RUFY3 participa de funções importantes nesta fase regressiva do desenvolvimento do SNC, como na remoção de neurônios excedentes, na retirada de conexões inadequadas, no controle da formação do axônio e na morfogênese do cone de crescimento (HERTZ et al., 2019; WEI et al., 2014). NOGO, também conhecido como inibidor de crescimento de neurite ou Reticulon 4, está presente na mielina possuindo papéis cruciais na restrição da regeneração axonal e no crescimento de fibra compensatória, quando há danos no SNC (SCHWAB, 2004). Esta proteína também pode desempenhar papéis importantes na coordenação do desenvolvimento da vasculatura cerebral (RANA et al., 2016) e na orientação do crescimento do axônio em regiões decisivas da via óptica (WANG, L. et al., 2016). Durante o desenvolvimento, nossos resultados mostram que NOGO aumenta sua expressão ao longo do desenvolvimento. Haybaeck demonstrou que NOGO-A foi expressa nas seguintes zonas corticais: Epêndima, zona ventricular, zona subventricular, zona intermediária, subplaca, placa cortical e zona marginal; e com o aumento da idade gestacional, o número de células positivas para esse gene diminuiu significativamente (HAYBAECK et al., 2012).

Foram também encontradas neste grupo A, diversas proteínas beta tubulinas, uma família de proteínas globulares que fazem parte da composição dos microtúbulos (*TUBB2A, TUBB3, TUBB4A*). A β -tubulina III é uma proteína expressa quase exclusivamente em neurônios, que está envolvida na neurogênese e na orientação e manutenção dos axônios. Seu papel na formação neuronal concebe seu uso como

marcador inicial da diferenciação em células neurais em progenitores (SIEBER-BLUM et al., 2006). Defeitos nos genes *TUBB2A* e *TUBB3* estão associados à displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais (FALLET-BIANCO et al., 2014).

Em B, há regulação negativa somente no menor tempo de diferenciação e observa-se que essas proteínas estão relacionadas ao metabolismo energético. A glicose é o combustível de energia cerebral fetal e pós-natal, mas inicialmente a utilização de glicose cerebral é baixa e aumenta com a maturação e com o aumento da heterogeneidade regional (VANNUCCI; VANNUCCI, 2000). Uma das vias com maior enriquecimento é a gliconeogênese. Apesar de ser descrita como uma via presente no fígado, rim, intestino ou músculo, existe evidências de que a gliconeogênese existe em astrócitos cerebrais, com hipóteses de ser uma importante fonte alternativa de glicose para os neurônios (YIP et al., 2017). Estudos em modelos animais sugerem a expressão de enzimas reguladoras específicas que catalisam a gliconeogênese, em períodos de tempo específicos durante o desenvolvimento cerebral (KALHAN; PARIMI, 2000).

Os grupos de proteínas C e D, tendem a diminuir a expressão ao longo do desenvolvimento. Processos e vias biológicas de maior enriquecimento desses dois grupos estão descritas na figura 24, em um gráfico de barras.

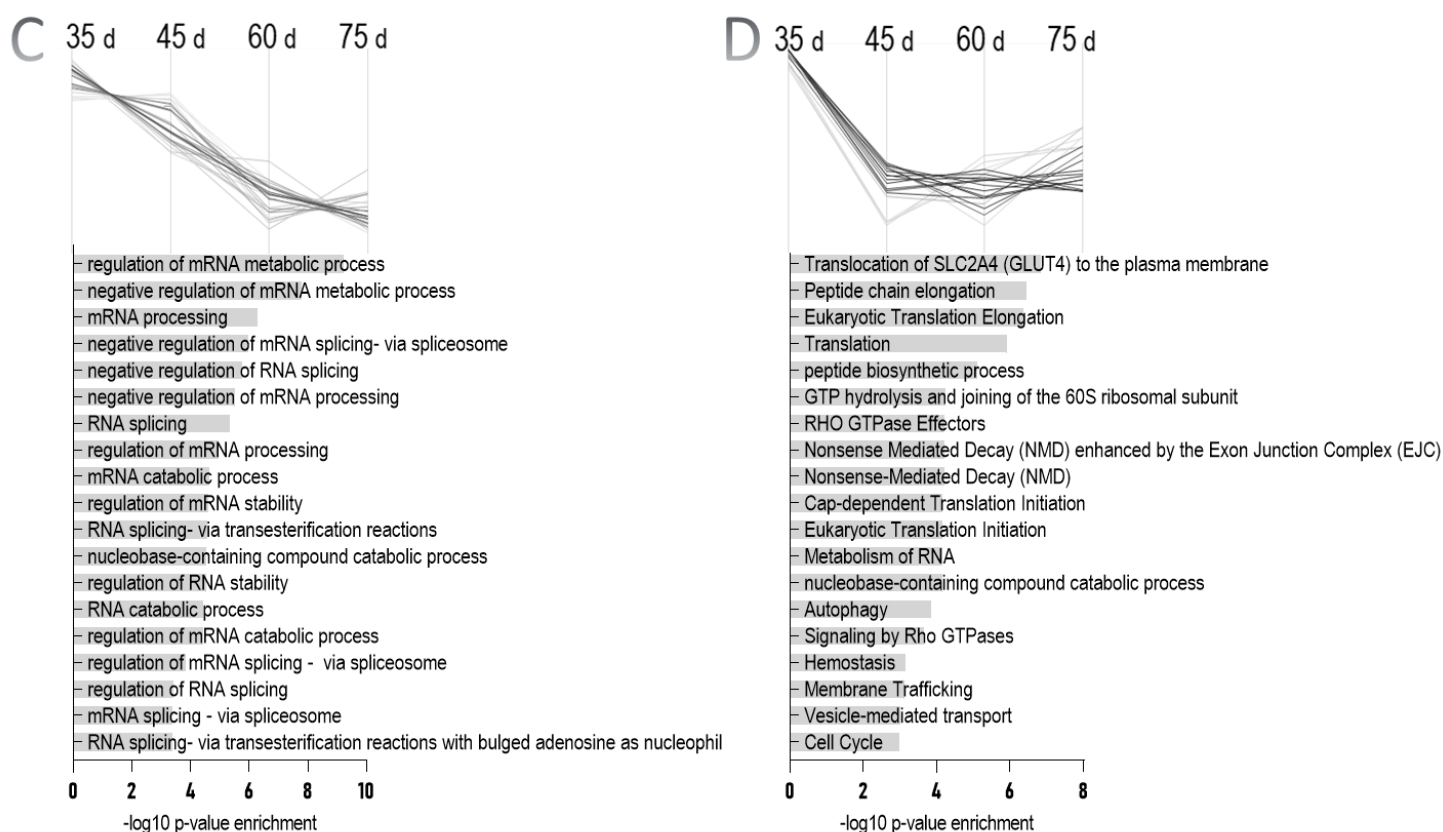


Figura 24 - Termos GO e reactome $[-\log_{10}(\text{valor } p)]$ significativamente enriquecidos em forma de gráfico de barras dos grupos C e D com mesma tendência de expressão.

Em C, observa-se a expressão decrescente dessas proteínas ao longo do tempo de cultura, com regulação positiva nos dois estágios iniciais. Esse grupo de proteínas apresentam, em vias e processos enriquecidos, termos relacionados com a síntese proteica, como processamento e regulação do RNA e mRNA. Já em D, há somente regulação positiva no menor estágio de diferenciação. Esse grupo de proteínas possui termos enriquecidos de vias e processos relacionados a proliferação celular e a síntese proteica, como metabolismo de RNA, tradução de mRNAs, biossíntese de peptídeos, ciclo celular e processos relacionados ao transporte celular, com tráfego de moléculas intracelular e por membranas.

Há enriquecimento também de uma série de vias relacionadas às Rho GTPases, pequenas proteínas de ligação que controlam uma variedade de processos biológicos. Reguladores e efetores Rho GTPases desempenham importante papel para desenvolvimento adequado dos neurônios, principalmente no crescimento e diferenciação de neuritos, estabelecendo a morfologia neuronal. Esses e os outros

processos indicam que o perfil dessas proteínas (grupo C e D) é diferente das proteínas mais expressas nos estágios mais amadurecidos (grupo A e B). Apesar dessas vias relacionadas a Rho terem relação ao desenvolvimento dos neurônios, as vias aumentadas nos demais estágios indicam regulação positiva para eventos relacionados a maturação de neurônios.

Os grupos de proteínas E e F, tendem a ter maior expressão no estágio de 45 dias de desenvolvimento. Os processos e vias biológicas de maior enriquecimento desses grupos estão descritas na figura 25, em gráficos de barras.

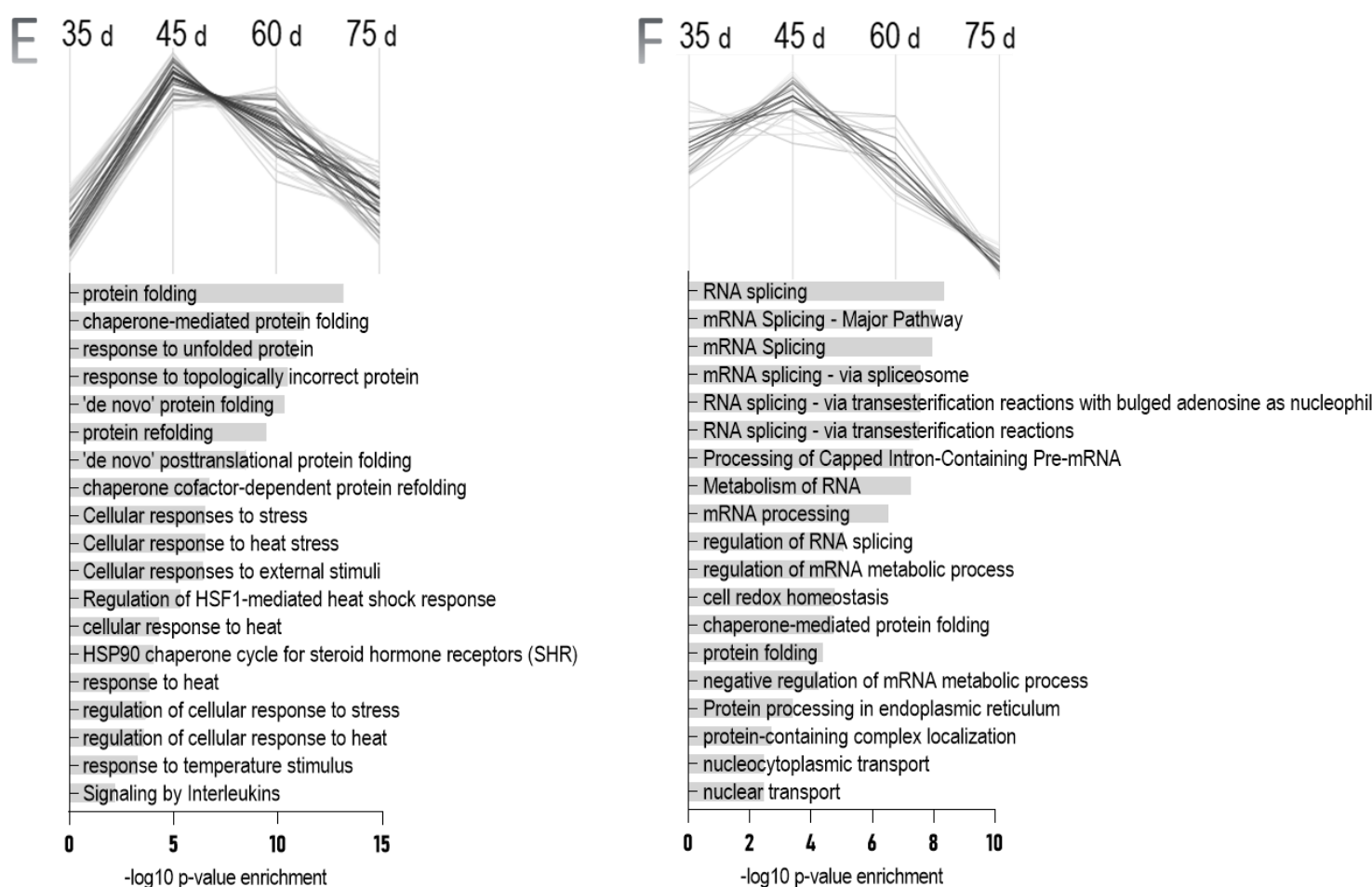


Figura 25 - Termos GO e reactome [$-\log_{10}$ (valor p)] significativamente enriquecidos em forma de gráfico de barras dos grupos E e F com mesma tendência de expressão.

No grupo de proteínas E, há maior expressão no estágio de 45 dias de diferenciação e os termos mais enriquecidos dessas proteínas, em geral, estão relacionados ao enovelamento de proteínas e também à resposta celular ao estresse e estímulo. Hansberg (2008), descreve que o processo de diferenciação celular é uma

resposta ao estresse oxidativo. A transição entre o estado indiferenciado para o estado diferenciado, que são ambos estáveis, ocorre por meio de um estado transitório instável, no qual há presença de ROS em níveis maiores que a capacidade da célula, com a indução de mecanismos antioxidantes (HANSBERG et al., 2008). A modulação do equilíbrio redox é capaz de conduzir diferentes funções celulares, desde a diferenciação até a proliferação.

O estresse térmico moderado faz parte do processo de diferenciação neural. A ativação de uma resposta a um estresse celular induz a expressão de proteínas de choque térmico, que atuam como chaperonas, para facilitar o dobramento e redobramento correto de proteínas, sendo essenciais para a recuperação dos danos celulares causados pela conformação proteica em neurônios (FAN, 2012). Células progenitoras neurais, com características ainda indiferenciadas, quando diferenciam a um estado semelhante à de neurônios diminuem a indução da resposta ao calor e consequentemente ocorre um aumento da vulnerabilidade neuronal (YANG et al., 2008). O estresse térmico moderado pode exercer efeitos benéficos sobre os neurônios ao desacelerar as alterações neuropatológicas, evitando o dobramento incorreto de proteínas e consequentemente aumentando a sobrevivência do neurônio sob estresse (MANE; GAJARE; DESHMUKH, 2018). Condições que poderiam benéficamente proteger neurônios em distúrbios neurodegenerativos, como doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, por exemplo.

CAPÍTULO 7**RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES EM ORGANOIDES CEREBRAIS
DE PACIENTE COM AGENESIA DO CORPO CALOSO**

7.1 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA DE ORGANOIDES CEREBRAIS E ORGANOIDES CEREBRAIS DE PACIENTE COM ACC

Nessa etapa de estudo, propomos inicialmente comparar, por proteômica quantitativa, organoides cerebrais de células de paciente com ACC versus organoides cerebrais controle. O tempo chave para nosso estudo proteômico foi o estágio de 45 dias, escolhido de acordo com as premissas anteriores, de ser um tempo chave de diferenciação desses organoides cerebrais. No entanto, algumas características fenotípicas das culturas celulares, geradas a partir das células epiteliais desdiferenciadas de pacientes com ACC, fizeram-nos modificar algumas estratégias de análise e criar novas perspectivas para este estudo proteômico.

Ao comparar organoides com 45 dias de diferenciação e organoides do mesmo tempo, mas cultivados a partir de células de paciente com ACC, observou-se diferenças morfológicas entre as diferentes culturas. Organoides com ACC apresentam tamanhos maiores, mais regionalização e mais zonas proliferativas em sua estrutura, semelhante à organoides mais amadurecidos, como pode ser observado nas imagens da figura 26.

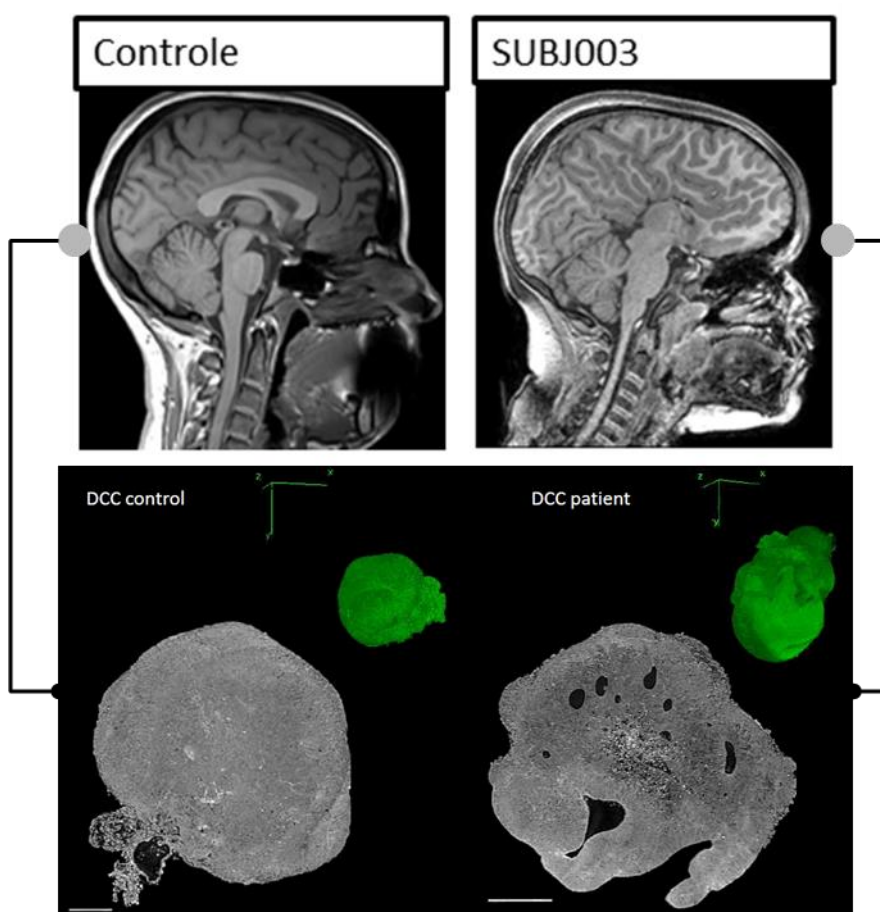


Figura 26 – Ressonância magnética da região encefálica do controle e do paciente com ACC e os respectivos organoides cerebrais com 45 dias de diferenciação.

Para nova estratégia proteômica, foram utilizados três tempos de diferenciação dos organoides cerebrais, 45, 60 e 75 dias para comparar com o tempo chave, de 45 dias de organoides cerebrais com ACC. Esta análise também foi realizada utilizando estratégia de quantificação com marcação isotópica, de acordo o fluxo de trabalho descrito na figura 11-C, do capítulo 4. As três replicatas biológicas de cada uma dessas condições foram submetidas à digestão triptica. Os peptídeos resultantes de cada biológica foram marcados com um kit iTRAQ 4-plex e misturados na mesma razão 1:1:1:1. A mistura de peptídeos foi pré-fracionada em um HPLC *offline* utilizando uma coluna HILIC em 25 frações. O perfil cromatográfico de cada réplica biológica está descrito na figura 27.

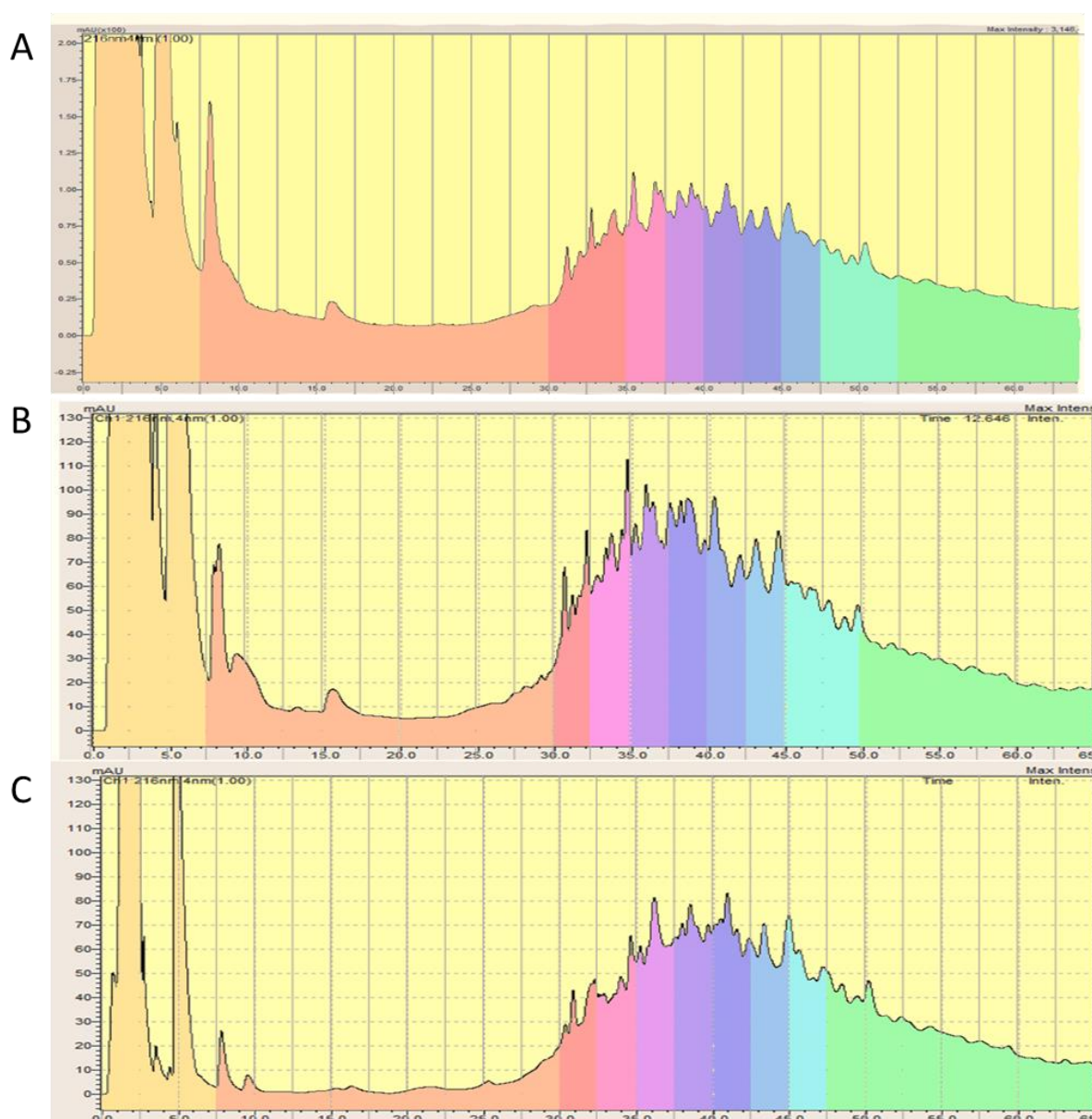


Figura 27 - Cromatogramas obtido pelo fracionamento offline HILIC e cada cor corresponde a uma fração ou pool de frações analisadas via LC-MS/MS. A: Cromatografia referente a primeira biológica. B: Cromatografia referente a segunda biológica. C: Cromatografia referente a terceira biológica.

Para a análise via LC-MS/MS no Q-exactive Plus, foram utilizados 10 frações e pool de frações de cada replicata biológica, de acordo com a intensidade dos picos. Cada fração foi analisada, em triplicata e, posteriormente, os dados gerados dessa análise foram processados em conjunto no Proteome discoverer 2.4. Foram identificadas 5.252 proteínas de característica *Master*, grupos de proteínas com redundância de identificação, 28.258 peptídeos, foram determinados 118.749 PSMs.

Para as análises dos dados obtidos, foi realizado previamente a padronização das abundâncias dos canais do iTRAQ, relativa as proteínas identificadas (figura 28).

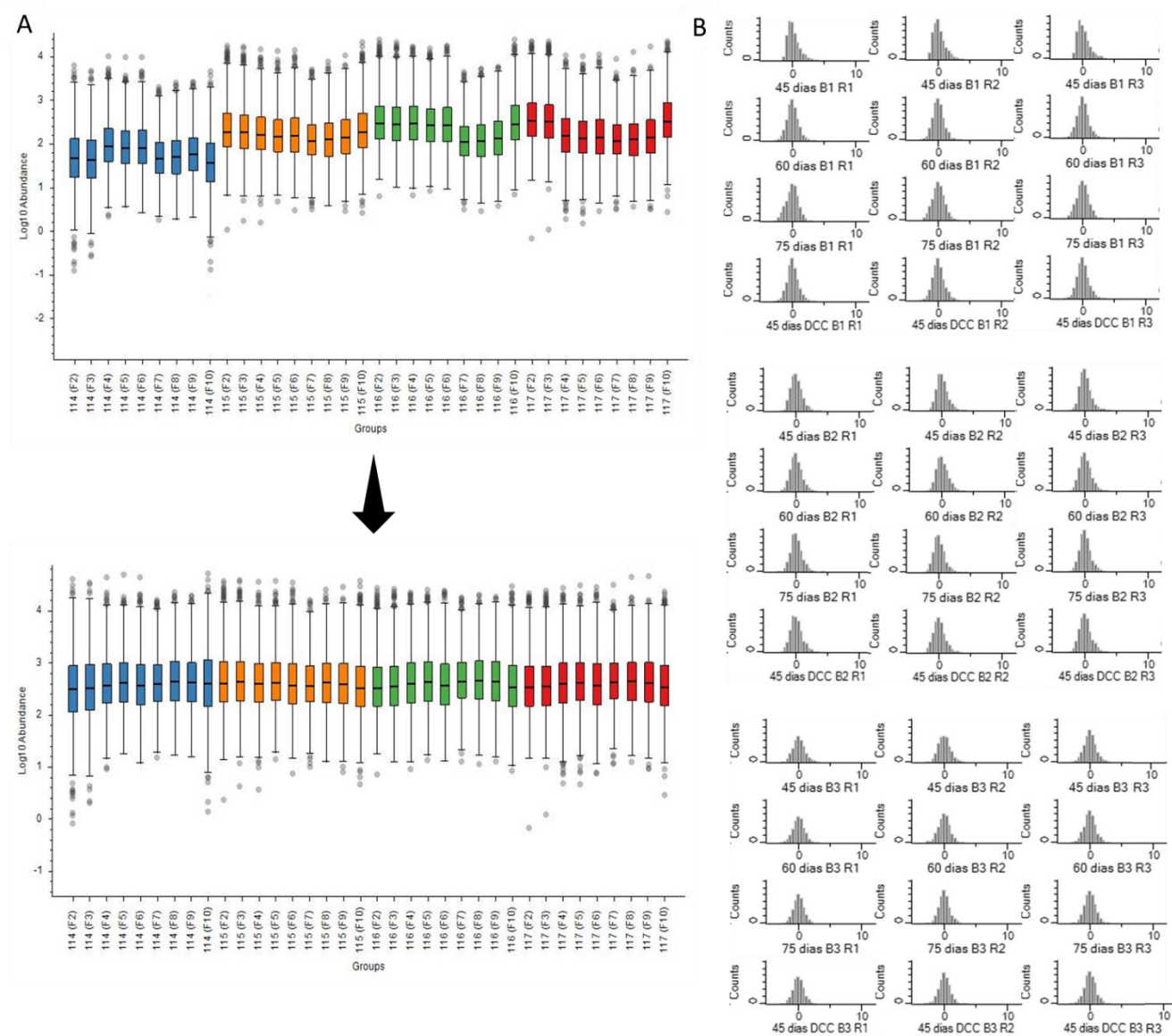


Figura 28 – Qualidade dos dados proteômicos. A: Gráficos de linha e box-plots mostrando antes e depois da normalização dos valores brutos de abundância dos canais do iTRAQ após análise no proteome discoverer 2.4 dos dados obtidos via LC-MS/MS. B: Histograma correspondente a padronização dos dados das replicatas técnicas e biológicas de cada amostra.

Para comparar cada estágio de desenvolvimento, foi realizado uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), onde interpreta-se, por representações, diferenças significativas entre os grupos experimentais. É um método supervisionado, que fornece a representação visual dos dados também por meio de

redução de dimensionalidade como o PCA, mas orienta as dimensões transformadas pela variabilidade entre os grupos (BARKER; RAYENS, 2003). A PLS-DA pode ser aplicado a diversos casos, permitindo tratar conjuntos de dados com o baixo número de observações e alto número de variáveis. Além disso, também pode ser aplicado em conjuntos com valores ausentes.

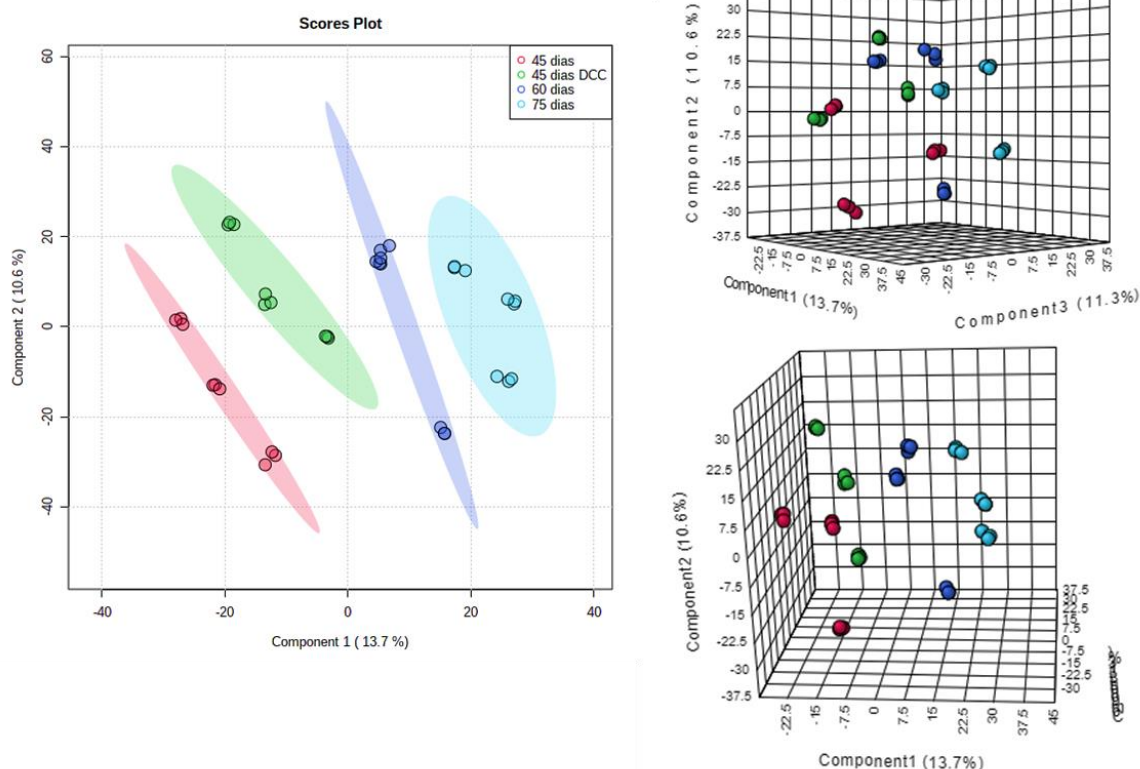


Figura 29 - Gráficos PLS-DA em 2D e 3D representando os três estágios de diferenciação dos organoides (45 dias em vermelho; 60 dias, em violeta; 75 dias, em azul) e o organoide com 45 dias com ACC (em verde).

Por PLS-DA verificou-se as semelhanças e diferenças entre os organoides analisados, baseadas na representação da figura 29. A partir deste resultado, verificamos se a hipótese dos organoides de 45 dias com ACC amadurecem mais rapidamente e se são semelhantes a algum estágio mais maduro em relação as proteínas. E o que se observa, pelas interpretações do PLS-DA, que o grupo dos organoides com ACC não se sobrepõe ou se aproxima de nenhum outro, indicando que diferem dos demais organoides normais, em diferentes tempos e que

possivelmente possuem características únicas em suas funções biológicas relacionadas as proteínas identificadas.

Este tipo de análise por PLS-DA pode ser eficaz tanto como seletor quanto como classificador e tem aumentado a sua popularidade de uso em dados ômicos, que são conjuntos de dados que costumam ter muito menos amostras do que variáveis, além de ruídos em seus valores e muitos dados ausentes (ROHART et al., 2017; RUIZ-PEREZ et al., 2020). No entanto, os dados estão sujeitos *overfitting* e a validação cruzada é de suma importância, pois indica quando PLS-DA está sendo usado de forma ineficaz (RUIZ-PEREZ et al., 2020). Para nosso PLS-DA predito anteriormente, foi feita a validação cruzada pelo método *10-fold* e o resultado está descrito no gráfico da figura 30.

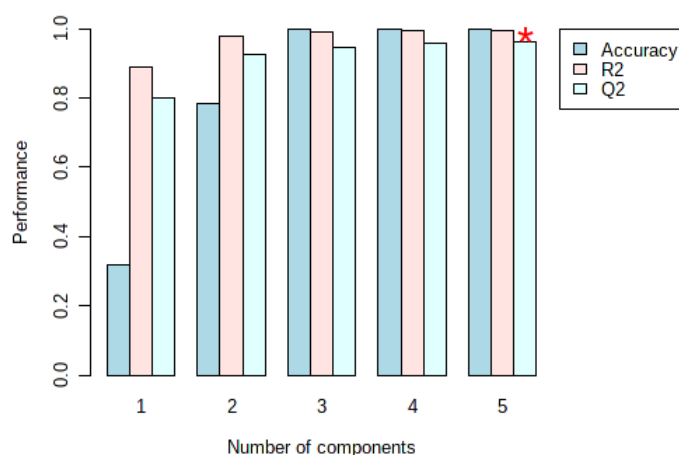


Figura 30 - Gráfico representando resultado da validação cruzada 10-fold do PLS-DA.

O índice Q2 acumulado mede a qualidade global do ajuste e a qualidade preditiva dos modelos. Idealmente, Q2 deve ser próximo a 1, e nesta validação Q2 permanece alto nos 5 componentes gerados pela regressão PLS, indicando que a qualidade do ajuste não é muito dependente dos modelos e descreve uma boa classificação. Os índices R2 dos 5 componentes são muito próximos de 1, indicando que correspondem às correlações entre as variáveis e observáveis. Portanto, este modelo predito possui qualidade em suas interpretações pois a validação cruzada mostra que é uma descrição mais próxima da realidade experimental e não um modelo altamente ajustado aos grupos descritos.

7.1.1 Proteínas diferenciais entre organoides cerebrais e organoides cerebrais com ACC

Para verificar as possíveis proteínas diferenciais comparando os organoides ACC com 45 dias com os demais estágios saudáveis com 45, 60 e 75 dias, foram realizados testes estatísticos clássicos, como ANOVA ($p < 0,05$). Além deste, foi necessário realizar um teste da diferença honestamente significativa (honestly significant difference - HSD), conhecido como teste de Tukey, que indica entre quais grupos a diferença determinada no teste ANOVA é significativa.

A análise resultou em 446 proteínas reguladas entre as amostras e foram determinadas as proteínas reguladas positivamente e negativamente (*up* e *down regulated*), nos seguintes pares: 45 dias / ACC; 60 dias / ACC; 75 dias / ACC. Foram determinadas através do Teste de Tukey e os números estão descritos na figura 31-A. Essas análises foram realizadas com o intuito de verificar o perfil das proteínas reguladas em relação ao ACC, quando comparadas aos demais estágios. Também foram realizadas essas comparações com o intuito de confirmar o resultado obtido no PLS-DA, se esses organoides são únicos e diferentes, durante seu processo de diferenciação. Ao observar os genes diferenciais em comum, a grande maioria se sobrepõe em relação a ter ou não ter o ACC, figura 31-B. Essa sobreposição de proteínas está relacionada ao ACC e não está totalmente aleatória, indicando que há maiores diferenças entre os organoides gerados de células de pacientes com ACC. Na figura 31-C, foi feito um diagrama de Venn, através da ferramenta online InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/>) mostrando, as diferenças e intersecções dos genes desses grupos, em números (HEBERLE et al., 2015).

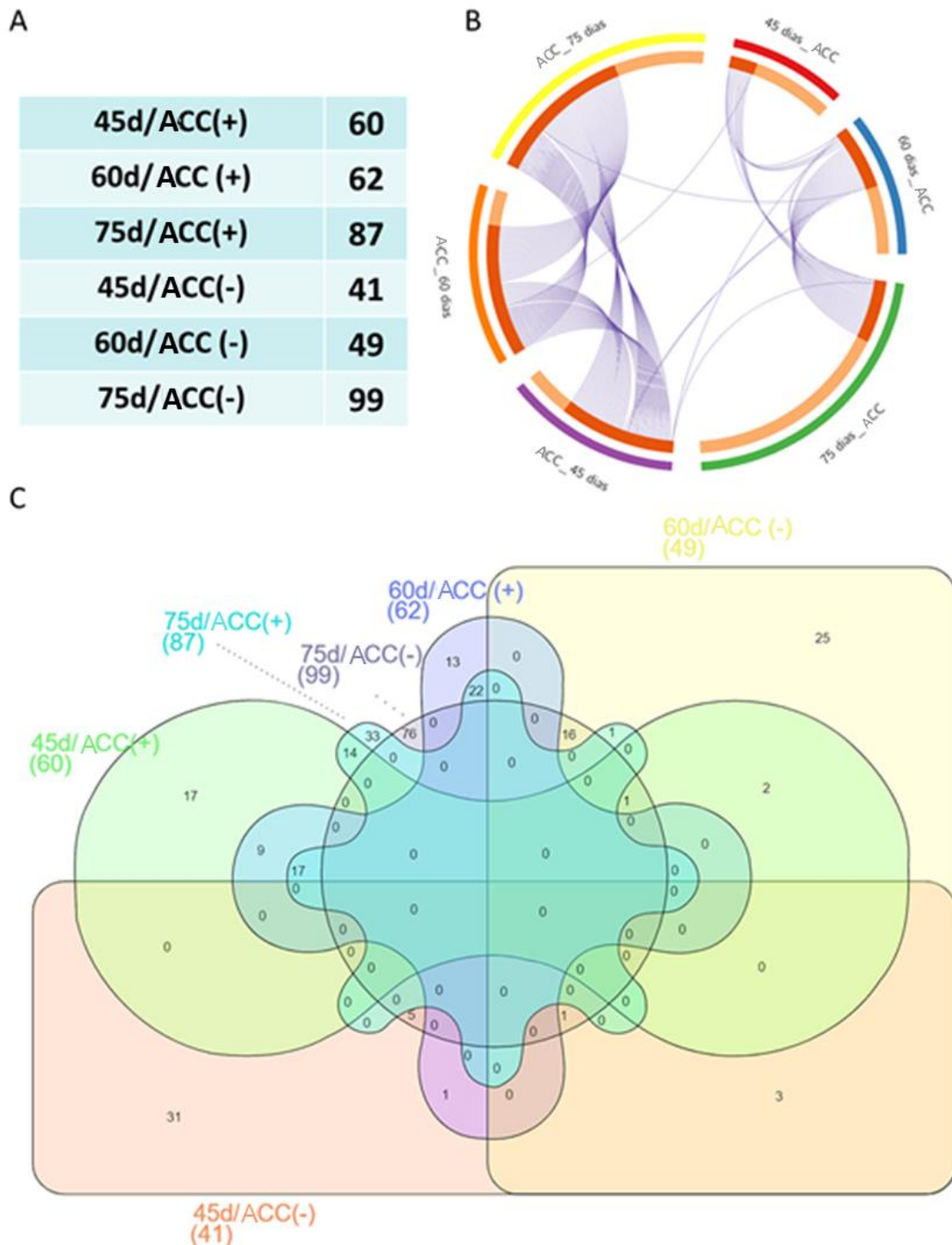


Figura 31 – Proteínas diferenciais dos organoides com ACC. A: Tabela com total de cada comparação em pares. B: Sobreposição das proteínas diferenciais, indicando que a sobreposição dos genes regulados é em relação ao ACC e não aleatória entre os diferentes tempos. C: Diagrama de Venn dos três pares comparativos contendo ACC regulado positivamente e negativamente. (Adaptado de HEBERLE et al., 2015)

As variações entre os organoides gerados das células de paciente com ACC e dos organoides com diferentes tempos, poderiam ser por influência de fatores genótipos desse indivíduo. Foram verificadas quais das proteínas diferenciais são em comum por um diagrama de venn, da figura 32. Foram observadas que em ACC(+) e ACC(-), 17 genes (fig. 32-A) e somente 1 (fig. 32-B), respectivamente, intercedem todas as comparações.

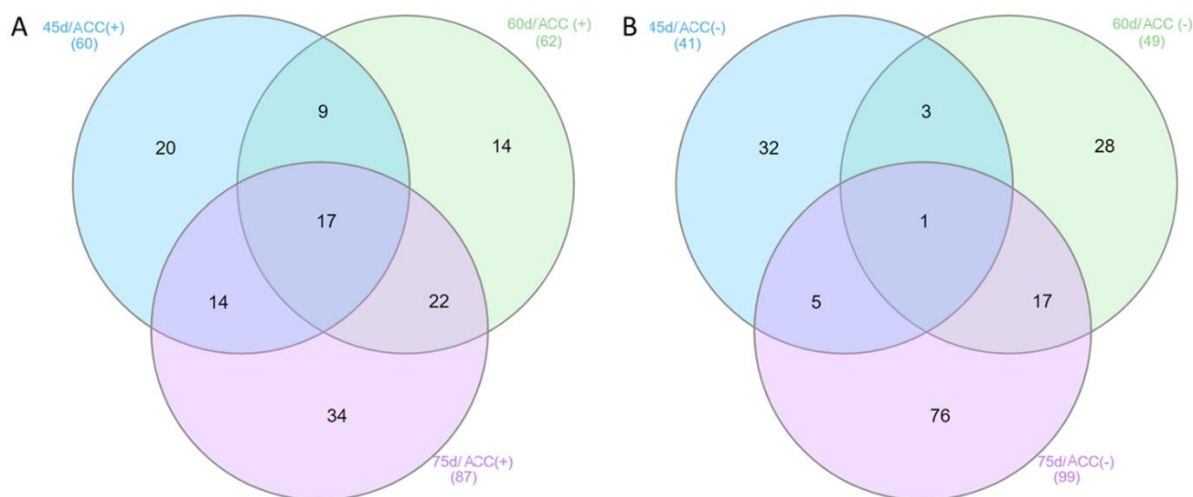


Figura 32 – Diagrama de Venn das proteínas diferenciais ACC(+), em A, e ACC(-), em B. (Adaptado de HEBERLE et al., 2015)

Dos 17 genes ACC(+) que fazem parte das três comparações, foram determinados as ontologias genéticas, em processos biológicos e componentes celulares, que cada uma dessas proteínas pode estar relacionada. As seguintes informações, descritas na tabela 3, foram obtidas no repositório UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Tabela 3 - genes diferenciais que coexiste nos diferentes pares de comparações com ACC(+) (continua)

Uniprot	Gene	Proteína	GO (processo biológico)	GO (componente celular)
P78347	GTF2I	Fator de transcrição II-I geral	regulação negativa da angiogênese; regulação positiva do reparo de DNA por transcrição do promotor de RNA polimerase II	citoplasma; membrana; nucleoplasma; núcleo
P06744	GPI	Glicose-6-fosfato isomerase	glicólise canônica; processo metabólico de carboidratos; gliconeogênese; processo metabólico de glicose	citossol; exossomo extracelular; região extracelular; lúmen do grânulo rico em ficolina-

				6-fosfato; processo glicolítico; hemostasia; resposta imune humoral; desgranulação de neutrófilos; regulação positiva da migração de células endoteliais; regulação positiva da produção de imunoglobulina	1; membrana; nucleoplasma; membrana plasmática; lúmen do grânulo secretor
Q9BUQ8	DDX23	Provável RNA helicase DDX23 dependente de ATP		montagem cis de spliceossomo pré-catalítico; processamento de mRNA, via spliceossomo; Desmontagem do R-loop; Splicing de RNA; Splicing de RNA, por meio de reações de transesterificação	spliceossomo catalítico da etapa 2; cromatina; exossomo extracelular; nucléolo; nucleoplasma; núcleo; Complexo U4 / U6 x U5 tri-snRNP; U5 snRNP
P56545	CTBP2	Proteína de ligação C-terminal 2		resposta celular ao fator inibidor da leucemia; regulação negativa da proliferação da população de células; regulação negativa da transcrição, modelada por DNA; regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II; regulação positiva da ligação à cromatina; regulação positiva da via de sinalização do receptor do ácido retinóico; regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase II; encaixe da vesícula sináptica; replicação do genoma viral; diferenciação de glóbulos brancos	Sinapse GABA-érgica; sinapse glutamatérgica; núcleo; sinapse da fita do fotorreceptor; componente citoplasmático da zona ativa pré-sináptica; citosol pré-sináptico; complexo repressor de transcrição
P13489	RNH1	Inibidor de ribonuclease		processo catabólico do mRNA; regulação da angiogênese	complexo angiogenina-PRI; citosol; exossomo extracelular; nucleoplasma
P27708	CAD	Proteína CAD		processo biossintético 'de novo' de nucleobase de pirimidina; processo biossintético 'de novo' de UMP; regeneração de órgãos animais; resposta celular à droga; resposta celular ao estímulo do fator de crescimento epidérmico; processo biossintético da citrulina; processo metabólico de drogas; gravidez feminina; processo metabólico da glutamina; desenvolvimento do	projeção de células; citoplasma; citosol; exossomo extracelular; membrana; corpo celular neuronal; matriz nuclear; nucleoplasma; núcleo; complexo contendo proteína; botão terminal

			coração; lactação; desenvolvim ento do fígado; processo metabólico de compostos de nitrogênio; fosforilação de peptidil- treonina; autofosforilação de proteínas; processo biossintético do nucleosídeo de pirimidina; resposta à amina; resposta à cafeína; resposta ao cortisol; resposta à insulina; resposta à fome; resposta à testosterona; Processo biossintético UTP	
Q93009	USP7	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase 7	desubiquitinação da lisina C- terminal conservada com histona H2B; manutenção da metilação do DNA; desubiquitinação de proteína monoubiquitinada; desenvolvim ento de organismo multicelular; regulação negativa da atividade do fator de transcrição NF- kappaB; regulação negativa do processo catabólico da proteína dependente da ubiquitina proteassomal; regulação positiva da desmetilação do DNA; desubiquitinação de proteínas; desubiquitinação ligada à proteína K63; estabilização de proteínas; ubiquitinação de proteínas; regulação do ritmo circadiano; regulação da atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA; regulação da gliconeogênese; regulação da estabilidade da proteína; regulação do transporte retrógrado, endossomo para Golgi; regulação da transdução de sinal pelo mediador da classe p53; regulação do capeamento dos telômeros; processo rítmico; reparo de excisão de nucleotídeo acoplado a transcrição; processo catabólico de proteína	cromossomo; citosol; corpo nuclear; nucleoplasma; núcle o; PML body; complexo contendo proteína

			dependente de ubiquitina; processo viral	
P49458	SRP9	Proteína de partícula de reconhecimento de sinal 9kDa	regulação negativa do alongamento translacional; Direcionamento de proteína cotranslacional dependente de SRP para a membrana	citosol; partícula de reconhecimento de sinal, direcionamento de retículo endoplasmático; complexo receptor de partícula de reconhecimento de sinal
Q00796	SORD	Sorbitol desidrogenase	motilidade espermática flagelada; processo biossintético da frutose; processo metabólico da glicose; processo catabólico de glucuronato em 5-fosfato de xilulose; Processo catabólico de L-xilitol; Processo metabólico do L-xilitol; resposta ao íon cádmio; resposta ao íon cobre; resposta à droga; resposta ao hormônio; resposta aos níveis de nutrientes; resposta ao estresse osmótico; processo catabólico de sorbitol	citosol; exossomo extracelular; espaço extracelular; membrana; membrana mitocondrial; cílio móvel
P60228	EIF3E	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade E	formação de complexo de iniciação de tradução citoplasmática; regulação negativa da iniciação translacional; processo catabólico do mRNA transcrito nuclear, decaimento mediado por nonsense; regulação positiva da ligação do mRNA; regulação positiva da tradução; regulamentação da iniciação translacional; iniciação translacional	citoplasma; citosol; complexo de pré-iniciação 43S eucariótico; complexo de pré-iniciação 48S eucariótico; complexo eucariótico do fator de iniciação da tradução 3; complexo eucariótico do fator de iniciação da tradução 3, eIF3e; exossomo extracelular; membrana; núcleo; citoplasma; núcleo; Corpo PML
P04040	CAT	Catalase	respiração aeróbica; envelhecimento; resposta celular ao estímulo do fator de crescimento; resposta celular ao estresse oxidativo; processo metabólico do colesterol; processo metabólico da hemoglobina; processo catabólico de peróxido de hidrogênio; regulação negativa do processo apoptótico; regulação negativa da atividade do fator de transcrição NF-kappaB; desgranulação de	citoplasma; citosol; retículo endoplasmático; exossomo extracelular; região extracelular; lúmen do grânulo rico em ficolina-1; adesão focal; Aparelho de Golgi; organela delimitada por membrana intracelular; lisossoma; membrana; espaço intermembranar mitocondrial; mitocôndria; matriz peroxissômica; membrana peroxissômica; peroxissomo; membrana plasmática; complexo

				neutrófilos; diferenciação de osteoblastos; regulação positiva da divisão celular; regulação positiva da atividade do fator de transcrição NF-kappaB; regulação positiva da sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase; localização de proteínas; resposta à atividade; resposta ao íon cádmio; resposta à droga; resposta ao estradiol; resposta ao etanol; resposta ao ácido graxo; resposta ao peróxido de hidrogênio; resposta à hiperóxia; resposta à hipóxia; resposta à inatividade; resposta à insulina; resposta ao ácido L-ascórbico; resposta ao íon de chumbo; resposta à intensidade da luz; resposta ao ozônio; resposta ao fenilpropanóide; resposta a espécies reativas de oxigênio; resposta à vitamina A; resposta à vitamina E; processo metabólico de triglicerídeos; desenvolvimento do botão ureteral; proteção UV	contendo proteína; lúmen do grânulo secretor
P56211	ARPP19	Fosfoproteína regulada por cAMP	19	divisão celular; Transição G2 / M do ciclo celular mitótico; ciclo celular mitótico; regulação negativa da desfosforilação de proteínas; regulação positiva da gliconeogênese; regulação positiva da importação de glicose	citoplasma; nucleoplasma
O75525	KHDRBS3	Proteína associada à transdução de sinal contendo domínio KH, ligação a RNA	3	processamento de mRNA; regulação de splicing alternativo de mRNA, via spliceossomo; regulação de splicing de mRNA, via spliceossomo; processo viral	nucleoplasma; núcleo; complexo contendo proteína
P62312	LSM6	Proteína semelhante a Sm associada a snRNA U6	LSm6	catabolismo exonucleolítico de mRNA deadenylated; maturação de SSU-rRNA; processo catabólico do mRNA; processamento de mRNA, via spliceossomo; Splicing de RNA; processamento de tRNA	citoplasma; citosol; Complexo Lsm2-8; nucléolo; nucleoplasma; núcleo; Corpo P; pequeno complexo de ribonucleoproteína nuclear; sno (s) complexo de ribonucleoproteína contendo

					RNA; Spliceossomo pré-catalítico do tipo U2; Complexo U4 / U6 x U5 tri-snRNP; U6 snRNP
O75152	ZC3H11A	Proteína contendo o domínio CCCH indicador de zinco	11A	processamento da extremidade 3 'do mRNA; exportação de mRNA do núcleo; poli (A) + exportação de mRNA do núcleo; Exportação de RNA do núcleo	nucleoplasma
Q96L92	SNX27	Classificando nexin-27		transporte endossomal; transporte do endossoma para o lisossoma; estabelecimento da polaridade da célula natural killer; transporte intracelular de proteínas; transporte retrógrado, endossoma para a membrana plasmática; transdução de sinal	citossol; endossomo inicial; membrana endossômica inicial; endossomo; sinapse imunológica; nucleoplasma
Q12962	TAF10	Subunidade 10 do fator de iniciação da transcrição TFIID		processo apoptótico; conjunto complexo contendo proteína celular; Transcrição modelada por DNA, iniciação; Transição G1 / S do ciclo celular mitótico; diferenciação de hepatócitos; desubiquitinação de histonas; acetilação de histona H3; crescimento de organismo multicelular; desubiquitinação de proteínas; regulação da ligação ao DNA; regulação da expressão gênica; regulação da transdução de sinal pelo mediador da classe p53; transcrição por RNA polimerase II; iniciação da transcrição do promotor da RNA polimerase II	citoplasma; nucleoplasma; núcleo; Complexo PCAF; região perinuclear do citoplasma; Complexo STAGA; complexo de fator de transcrição TFIID; complexo de fator de transcrição TFTC

Fonte: *uniprot*

Observa-se que a grande maioria das proteínas descritas na tabela acima está correlacionada ao ciclo e desenvolvimento celular, com processos envolvendo transcrição, tradução e divisão celular. Além disso, outros processos biológicos como a resposta ao estresse oxidativo e ativação de vias glicolíticas estão em comum na cultura ACC, com genes participantes da regulação da glicólise e gliconeogênese, como GPI, ARPP19, SORD e USP7 (JIANG et al., 2017). A proteína USP7 é uma protease que cliva a ubiquitina de proteínas alvo e já foram observados que a

haploinsuficiência de USP7 pode causar transtornos do neurodesenvolvimento, com atrasos de fala, comportamentos alterados e anomalias neurológicas, sendo geralmente uma dessas anomalias a escassez de substância branca, impactando a formação de um CC delgado com vários graus de dismorfismo (FOUNTAIN et al., 2019). Esses processos são comuns à cultura de células iPSC (FOLMES et al., 2012; KIM; HEO; HAN, 2006) visto que essas vias metabólicas celulares influenciam o processo de proliferação, reprogramação ou diferenciação (ZHANG et al., 2018). São semelhantes às vias e processos super expressos nos estágios mais tardios, que foi supracitado no capítulo 6, figura 23.

Em relação as proteínas em comum de ACC(-) (figura 32-B), somente um gene faz parte das três comparações, o gene MTHFD1L, que codifica a proteína C1-tetraidrofolato sintase monofuncional mitocondrial. Essa proteína está envolvida na via de interconversão do tetraidrofolato, que faz parte do metabolismo de um carbono, importante na síntese '*de novo*' de purinas, timidilato e também na regeneração da metionina a partir da homocisteína (PRASANAN et al., 2003; WALKUP; APPLING, 2005). Apesar de sua semelhança com a C1-THF sintase citoplasmática humana, a distribuição tecidual da C1-THF sintase mitocondrial é bastante diferente, com transcritos relativamente baixos no fígado e rim (onde a isoenzima citoplasmática é mais abundante), no entanto mais elevados na placenta, seguidos pelo timo, baço, cérebro e pulmão (PRASANAN et al., 2003). Segundo as informações depositadas do repositório UniProt para esta proteína, dados de ontologias genéticas em processos biológicos indicam a sua relação com os seguintes processos: Processo biossintético do 10-formiltetraidrofolato; morfogênese do neurocrânio embrionário; morfogênese do viscerocrânio embrionário; processo metabólico de compostos contendo ácido fólico; processo metabólico do ácido fólico; processo metabólico de formato; fechamento do tubo neural e interconversão de tetraidrofolato. Esses processos biológicos se correlacionam com o desenvolvimento neural.

Durante o desenvolvimento embrionário, a exclusão de MTHFD1L pode causar letalidade embrionária e também defeitos no desenvolvimento craniofaciais e no fechamento do tubo neural (MOMB et al., 2013). O desenvolvimento normal do embrião necessita de uma interação precisa de proliferação e morte celular, como também da migração e diferenciação, fazendo com que o metabolismo do folato provavelmente seja crítico durante a embriogênese (MOMB; APPLING, 2014). O impacto da exclusão de MTHFD1L também se estende ao metabolismo energético,

com interrupções em vários metabólitos das vias envolvidas na produção de energia e no metabolismo de aminoácidos, podendo refletir distúrbios nos metabólitos do ciclo do TCA e da via glicolítica (BRYANT et al., 2018). Já foi demonstrado que a suplementação com folato durante a gestação normaliza as concentrações de uma grande proporção de metabólitos, que são perturbados pela perda de MTHFD1L durante o desenvolvimento do embrião (BRYANT et al., 2018; MOMB et al., 2013; SHIN et al., 2019).

As falhas do tubo neural são um dos defeitos congênitos bastante comuns em humanos. A baixa expressão deste gene pode estar associada ao não desenvolvimento do CC, visto que o fechamento adequado do tubo neural, durante o período de neurulação, pode ser crucial para a formação correta dos neurônios e a orientação adequada dos axônios calosos. Isso pode estar diretamente ligado a suplementação ineficiente de ácido fólico durante os primeiros meses gestacionais e/ou outros fatores genéticos pré-existentes que associados a diminuição da expressão de MTHFD1L, ocasionaram na agenesia total deste corpo caloso.

Como não é interessante verificar somente os genes diferenciais em comum pela amostra, mas também fazer a interpretação funcional das demais proteínas de cada par comparativo (ACC com 45, 60 e 75 dias), foram realizadas análises de enriquecimento de gene de cada par regulado positivamente e negativamente. Essas análises foram realizadas contrastando os respectivos conjuntos de genes com as bases de dados do GO, para processos biológicos e do REACTOME, para vias, utilizando ferramenta online METASCAPE. A figura 33 representa um resumo dos termos enriquecidos dos pares comparativos com ACC regulado positivamente e a Figura 34, um resumo dos termos enriquecidos dos pares comparativos com ACC regulado negativamente.

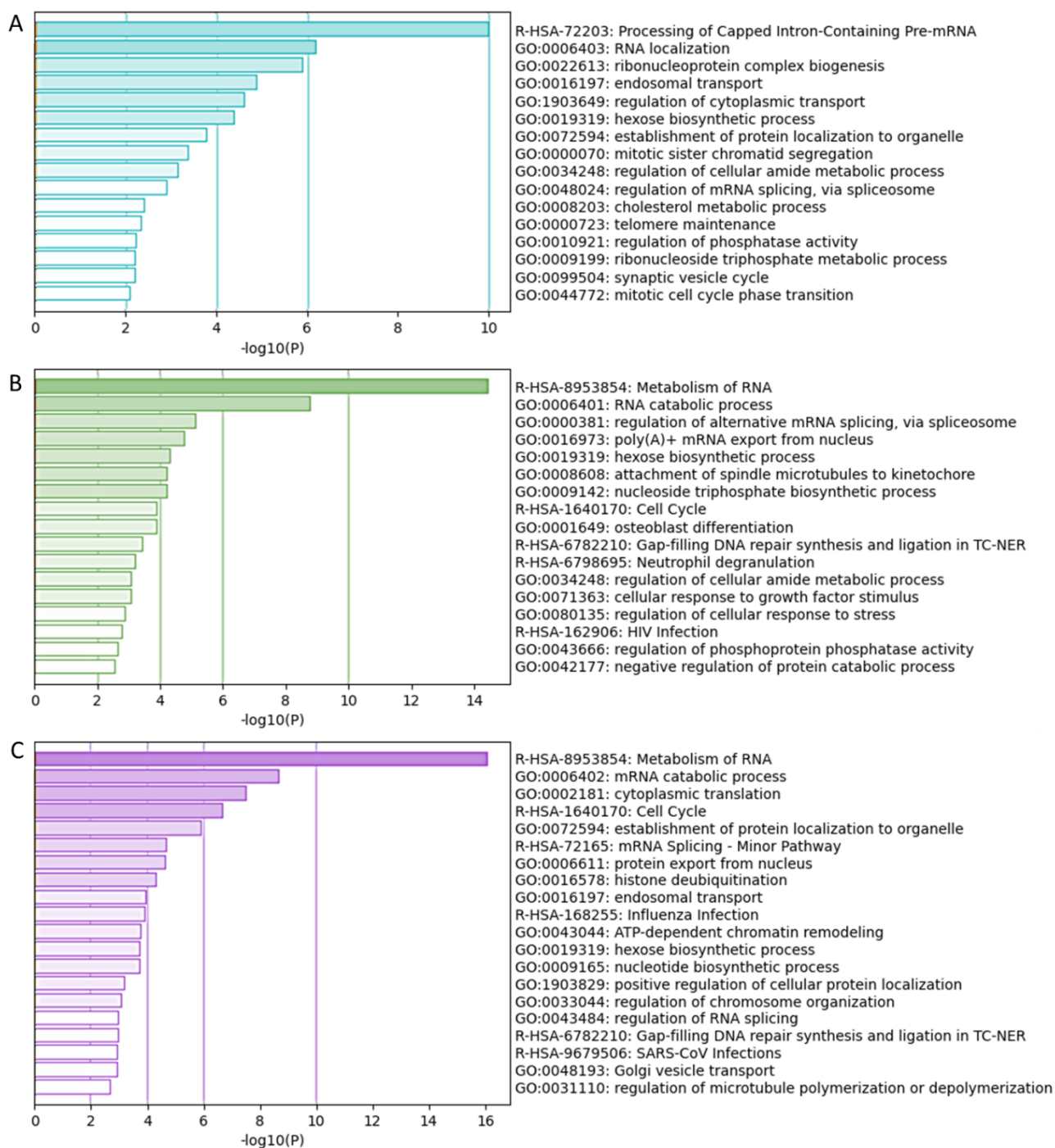


Figura 33 – Gráficos de barra contendo os pares comparativos em que ACC é regulado positivamente contra os demais tempos diferenciais de organoides, 45 dias, em A (azul); 60 dias, em B (verde); 75 dias, em C (roxo).

Foram observados em A, nos termos GO e REACTOME enriquecidos de 45/ACC (+), maior enriquecimento de uma via da etapa de processamento de pré-mRNA, via em que uma série de reações complexas de processamento ocorrem para que o transcrito de mRNA primário seja convertido em um mRNA maduro, antes de

sua tradução em um polipeptídeo. O processo para estabelecimento e manutenção da localização de RNA também aparece altamente enriquecido, no qual o RNA é transportado ou mantido em um local específico dentro da célula. Subsequente, é enriquecido um processo celular que resulta na biossíntese de RNA, proteínas e macromoléculas que estão envolvidas ou são constituintes na formação de um complexo ribonucleoproteico. Outros processos relacionados à manutenção do DNA, a regulação da biossíntese de peptídeos, ao estabelecimento da localização proteica e ao ciclo celular estão enriquecidos em relação a 45 dias. Observa-se que esses processos e vias estão relacionadas à transcrição e tradução de proteínas e também a proliferação celular, conforme foi encontrado no tópico 5.3, figura 24, semelhante ao organoide com menos tempo de diferenciação, como em 35 e 45 dias. Processos que estavam enriquecidos no grupo de proteínas com maior expressão somente no menor estágio, de 35 dias também foram enriquecidos em ACC, como transporte de moléculas intracelular e por membranas. contrariando as suposições de que os organoide de 45 dias com ACC desenvolvesse mais rapidamente, sustentada pelas suas características fenotípicas.

Diversas proteínas reguladas estão relacionadas ao transporte nuclear, um importante regulador do desenvolvimento que possui papéis críticos na diferenciação e sobrevivência celular. Diversos fatores de transporte estão envolvidos em vários estágios de diferenciação celular das iPSCs, são chaves no destino celular e alterações podem ocasionar defeitos no transporte nuclear que causariam diversos distúrbios de desenvolvimento (YASUHARA; OKA; YONEDA, 2009). Foram identificados diversos genes regulados positivamente em ACC comparado com 45 dias: NUP98 codifica o precursor de Nucleoporina 98 e 96 e faz parte da família das nucleoporinas, compostos que desempenham papéis na montagem e/ou manutenção do complexos de poros nucleares; RAN é o gene correspondente a proteína nuclear relacionada com ras, essencial para a translocação de RNA e proteínas, através do complexo de poro nuclear; ZC3H11A está envolvido na exportação de RNA nuclear; ELAVL1 codifica a proteína de ligação a RNA 1 e está envolvido na diferenciação de ESCs; NXF1 é um fator de exportação de RNA nuclear e é envolvido na exportação nuclear de espécies de mRNA com elementos de transporte constitutivos retrovirais e na exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma; CPSF3 codifica um membro da família metalo-beta-lactamase, o fator específico de clivagem e poliadenilação 3, que é uma proteína necessária para o processamento seletivo de microRNAs durante a

diferenciação de ESCs; (BATEMAN et al., 2021; DU et al., 2018; TANG; WONG-STAAAL, 2000; WANG, Y. et al., 2014)

No entanto, o processo metabólico do colesterol e o ciclo da vesícula sináptica estar enriquecido em relação ao estágio de 45 dias não descarta que o sistema biológico desses organoides com ACC tenham, de certo modo, maior robustez quando comparados seu controle de tempo com 45 dias. O encéfalo detém de uma boa parte do colesterol corporal, por ser um dos componentes mais presentes da bainha de mielina e também de microdomínios lipídicos, enriquecidos de colesterol e esfingolipídios, presentes membrana plasmática (Jangadas lipídicas, de *lipid rafts*, em inglês) de neurônios e astrócitos (ALLEN; HALVERSON-TAMBOLI; RASENICK, 2007; JACKSON SNIPES; SUTER, 1997).

A maior parte do colesterol cerebral é derivado por síntese “*de novo*”, independente da absorção alimentar ou da síntese hepática e se acumula entre o período perinatal e na adolescência quando os neurônios são mielinizados (ORTH; BELLOSTA, 2012). Tanto os neurônios em desenvolvimento quanto os astrócitos liberam colesterol em seu ambiente local, no entanto os níveis de colesterol no estado estacionário são maiores nos neurônios do que nos astrócitos (GENARO-MATTOS et al., 2019; HUSSAIN et al., 2019). Em nosso conjunto de dados foi identificado a apolipoproteína E (ApoE). O desenvolvimento de neurônios corticais é dependente da síntese de colesterol endógeno e, para isso, utiliza colesterol complexado com ApoE e precursores de esterol (MAHLEY, 2016).

O colesterol é uma molécula necessária também para a formação de sinapses e dendritos, revelando papéis importantes no processo de diferenciação neuronal (GORITZ; MAUCH; PFRIEGER, 2005). O processo biológico do ciclo das vesículas sinápticas também está enriquecido nesses organoides e, juntamente com metabolismo de colesterol enriquecido, sugere um aumento da sinaptogênese e estabilidade da liberação de neurotransmissores.

Presente nas membranas, as jangadas lipídicas são destaque em diversos estudos, por estarem envolvidas em muitas funções celulares como migração celular, plasticidade neuronal orientação e regeneração de axônios, intimamente relacionadas aos processos envolvidos no desenvolvimento neural e na recuperação funcional após lesões e doenças (GUIRLAND; ZHENG, 2019; HERNALIZ-LLORENS et al., 2021). Elas fornecem um ambiente para interações moleculares específicas entre receptores de membrana e componentes de sinalização intracelulares e, já foi demonstrado que,

medeiam respostas de orientação específicas dos cones de crescimento de nervos por BDNF (Fator neurotrófico derivado do encéfalo), da netrina-1 e da Semaforina-3A, com transdução de sinais (GUIRLAND et al., 2004).

Subsequente, observa-se na figura 33-B e 33-C os termos GO e REACTOME enriquecidos de 60d/ACC (+) e 75d/ACC (+), respectivamente. As vias e processos enriquecidos em ambos são semelhantes, com maior enriquecimento da via de metabolismo de RNA, em que abrange os processos pelos quais os produtos da transcrição de RNA são posteriormente modificados para produzir suas formas maduras e a regulação desses e outros processos (JASSAL et al., 2019). Outros processos enriquecidos são a degradação de RNA e mRNA, tradução, ciclo celular e modulação de splicing alternativo de mRNAs nucleares. Processos semelhantes ao de organoides com menos tempo de diferenciação, como em 35 e 45 dias, como supracitado acima, na comparação 45d/ACC (+).

Especificamente em 60d/ACC (+) (figura 33-B) observa-se a presença de alguns processos e vias relacionadas ao estresse celular e sistema imune, como a regulação da resposta celular ao estresse e a degranulação de neutrófilos, que é uma resposta a uma infecção. Como já citado anteriormente, são processos comuns à cultura celular e que indicam a diferenciação celular. Além desses, outros processos enriquecidos indicam a mesma condição, como resposta celular ao estímulo do fator de crescimento, que resulta em uma mudança no estado ou atividade para que ocorra a proliferação e diferenciação celular; e diferenciação de osteoblastos, processo pelo qual se adquire as características de osteoblastos, possivelmente relacionado a diferenciação em crista neural. Essas condições levam-nos a crer que os organoides com ACC passam por um estado transitório de diferenciação, como observado no tópico 4.3, em 45 dias.

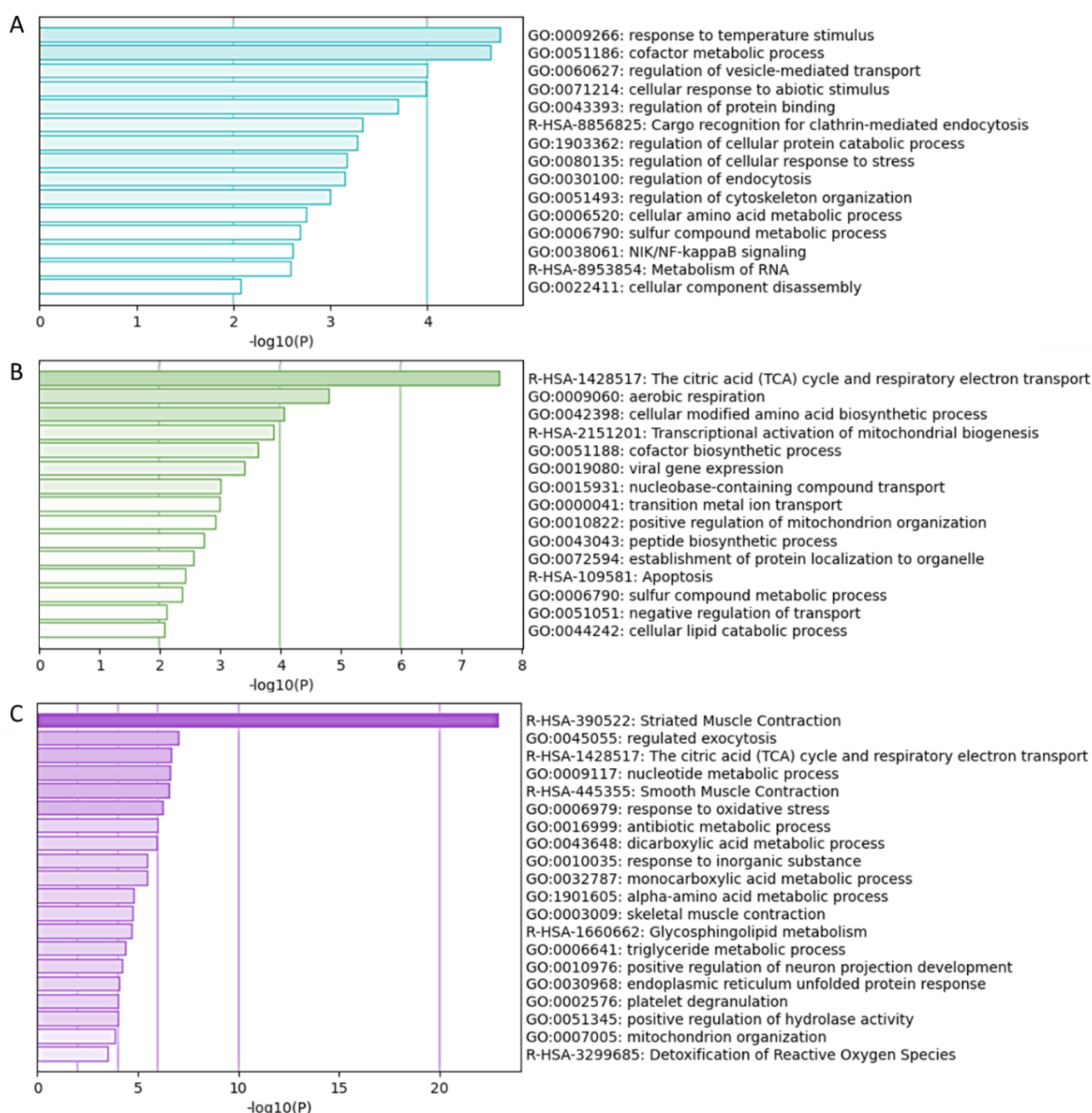


Figura 34 - Gráficos de barra contendo os pares comparativos em que ACC é negativamente regulado contra os demais tempos diferenciais de organoides, 45 dias, em A (azul); 60 dias, em B (verde); 75 dias, em C (roxo).

Em relação ao enriquecimento dos genes negativamente regulados da figura 34, foram observados em A, termos GO e REACTOME enriquecidos de 45d/ACC (-). Termos relacionados ao estresse celular estão enriquecidos como a resposta ao estímulo da temperatura, processo mais enriquecido, com genes diferenciais MAPK3, SOD1, APPL2, NUP133 e EIF2AK4. Genes que também compreendem vias e

processos como a resposta ao estresse, ao calor e a estímulos externos. A proteína superóxido dismutase 1 (SOD1), é fundamental na liberação de espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo e sua expressão aumentada eleva a produção de peróxido de hidrogênio, um agente altamente oxidante. A proteína adaptadora APPL2 participa da regulação de muitas atividades e processos biológicos, com grande potencial para modular o crescimento celular e da neurogênese. APPL2 é um potencial fator modulador para promover a gliogênese e regula a escolha do destino da célula durante a diferenciação de NSCs (GAO et al., 2020). Esses resultados surpreendem, pois indicam que o possível estado transitório de diferenciação dos organoides com ACC semelhante aos organoides de 45 dias, conflitam com esses termos de menor expressão em ACC. No entanto, corroboram com a hipótese de serem mais desenvolvidos, tendo em vista um meio intracelular menos oxidativo, com estresse mais atenuado no processo de diferenciação.

Foi identificado no conjunto de proteínas o gene DCC, que já foi amplamente associado a má formação do corpo caloso (MARSH et al., 2017, 2018). Essa associação, deve-se à sua relação com o desenvolvimento de neurônios comissurais que expressam e estendem seus axônios, mediados pela atratividade química de netrina-1 (SERAFINI et al., 1996). A proteína DCC é um receptor que ativa a sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e esta contribui para a sinalização de netrina (FORCET et al., 2002; KEINO-MASU et al., 1996). Já foi demonstrado que para o crescimento e orientação apropriada dos axônios, a proteína ACC se associa ajangadas lipídicas para funcionar como receptor do sinal da netrina-1, ativando a via MAPK / ERK (HÉRINCS et al., 2005). MAPK é uma proteína que apresentou regulação negativa nos organoides com ACC comparado à organoides de 45 dias. A expressão diminuída de MAPK e o enriquecimento positivo de vias do colesterol indica que o crescimento e a orientação axonal dos neurônios obtidos via reprogramação gênica de paciente com ACC sofre interferências no seu processo metabólico que, possivelmente, prejudicam seu funcionamento normal durante o desenvolvimento.

Dos termos GO e REACTOME enriquecidos de 60d/ACC (-) conforme descrito na figura 34-B, há uma série de vias e processos relacionados ao metabolismo energético. No SNC, o consumo de energia é dinâmico e o aumento da atividade neuronal impulsiona o aumento do consumo de energia, necessitando de um fornecimento contínuo de energia na forma de ATP (WATTS; POCOCK;

CLAUDIANOS, 2018). O ATP exigido pelos neurônios é gerado predominantemente dentro das mitocôndrias pela fosforilação oxidativa da glicose, por meio do ciclo do TCA e em comparação com os astrócitos, os neurônios favorecem a fosforilação oxidativa em relação à glicólise aeróbia (CUNNANE et al., 2020). A transmissão sináptica impõe uma grande demanda metabólica e plasticidade sináptica, aumentando ou diminuindo a força sináptica, pode impactar no gasto de energia cerebral (SCHULZ; HAUSMANN, 2019; WATTS; POCOCK; CLAUDIANOS, 2018).

A apoptose neuronal surge durante a embriogênese e afeta principalmente as células progenitoras, neurônios pós-mitóticos e células gliais (WONG; MARÍN, 2019). Neurônios de gânglios simpáticos, um dos modelos mais bem estudados de morte celular natural, durante o desenvolvimento embrionário tardio e o desenvolvimento pós-natal inicial, requerem fator de crescimento nervoso para sua sobrevivência (KRISTIANSEN; HAM, 2014). A diminuição de apoptose no organoide com ACC, em relação a 60 dias, pode não está relacionada a doença e sim ao desenvolvimento normal dos neurônios e a diferenciação celular, com a morte programada de precursores neurais.

Já em relação aos genes negativamente regulados com termos GO e REACTOME enriquecidos de 75d/ACC (-), conforme observado na figura 34-C, a via mais enriquecida (com $-\log p > 20$), é a da contração do músculo estriado. Esta via está relacionada ao processo em que o tecido muscular é ativado por um sinal do sistema nervoso. Os potenciais elétricos gerados, seguem pela medula espinal para a transdução de sinal, essencial para o funcionamento das células contráteis. Assim, neurotransmissores, como a acetilcolina, se ligam a receptores na superfície do músculo e provocam uma despolarização, fazendo com que os íons sódio/cálcio entrem pelos canais associados. Isso muda o potencial de membrana em repouso para um valor mais positivo e ativa os canais dependentes de voltagem, resultando em um potencial de ação, estimulando os canais de cálcio citosólico (KUO; EHRLICH, 2015). Diversos genes diferenciais estão envolvidos nesta via, como duas α -actininas (ACTC1 e ACTN2), que fazem parte dos microfilamentos da actina, miosinas (MYH3, MYLPF, MYL1, MYL4 e MYH8), que convertem energia química em energia mecânica por meio da hidrólise do ATP e troponinas (TNNT1, TNNT2) que regulam a sensibilidade ao cálcio do aparelho contrátil das miofibrilas dos músculos estriados. Organoides com maior idade desenvolvem maior complexidade, a ponto observarmos a presença genes relacionados à potenciais elétricos do sistema nervoso periférico,

um indicativo de que organoides com 75 dias de desenvolvimento são mais diferentes e possuem maior maturidade neural, quando comparados a organoides no tempo de 45 dias com ACC. Além deste, outros termos enriquecidos, como a diminuição de ROS e da resposta ao estresse oxidativo, o desenvolvimento de neurônios de projeção e o metabolismo de glicosfingolipídios corroboram com esta hipótese.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise proteômica com a estratégia de quantificação por iTRAQ permite analisar de forma simultânea condições diferentes, como foi aplicado neste trabalho em diversos modelos neurais. Esses resultados oferecem ricos recursos de dados que revelaram vias e processos regulados durante a diferenciação de neuroesferas, organoides cerebrais, na aplicação dos modelos para ACC.

A proteômica de neuroesferas no estudo da diferenciação comparando 3 e 10 dias de cultura mostrou que em momentos iniciais da indução neural, na formação de neuroesferas, várias proteínas que regulam a formação sináptica, a fixação da matriz e a orientação do axônio têm sua expressão aumentada, com diversos genes desta via identificados.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados como ponto de partida para futuras análises na busca de candidatos a marcadores de diferenciação e no uso desses esferóides como plataformas para teste de drogas terapêuticas e caracterização de doenças neurológicas. É importante ressaltar que o preparo das neuroesferas pode demorar até 3 dias, enquanto os organoides cerebrais geralmente são utilizados somente a partir de 30 dias em cultura. Isso torna o uso de neuroesferas atrativas, com uma boa relação custo/benefício, por recapitular tantas características cerebrais durante o desenvolvimento em um menor período de tempo com menor uso de recursos.

A proteômica de organoides cerebrais mostra o grande potencial dessa cultura para ser um modelo neural com diversas regiões compreendidas. Os dados obtidos revelam também que essa cultura permite o estudo da neurogênese, de acordo com a complexidade desse processo. Um ótimo modelo para um estudo fiel do neurodesenvolvimento e também na origem de diversas doenças relacionadas ao sistema nervoso que necessitam compreender diversos tecidos neurais e que não poderiam ser aplicadas em modelos animais, por exemplo, sem o fenótipo da doença.

No estudo do desenvolvimento neural comparando quatro diferentes tempos de cultura, nossos resultados indicam que os organoides cerebrais modelam o desenvolvimento em tempos cruciais para a formação SNC, aumentando sua complexidade neurológica ao longo do tempo de cultura. Observou-se resposta atenuada ao estresse térmico após 60 e 75 dias de diferenciação dos organoides cerebrais, mesmo em condições de respiração celular, um ambiente intracelular mais oxidativo. Isso possivelmente indica que os organoides do estágio de 45 dias passam pelo estado transitório de diferenciação, deixando o estado de células progenitoras,

indicando que este tempo é chave para estudo de processos iniciais de alta complexidade neural e também no uso para modelagem de doenças e transtornos do sistema nervoso.

A proteômica quantitativa de organoides cerebrais humanos reprogramados de células de paciente com disgenesia total do corpo caloso em contraste com três tempos controle de organoides cerebrais mostram que estes organoides são únicos em suas características. As análises de enriquecimento revelaram processos semelhantes a organoides com tempos menores de cultura. No entanto, o aumento de colesterol no SNC pode ser um fator que contribui para que ocorra maior crescimento e desenvolvimento axonal dos organoides com ACC. Este aumento, explicaria, por exemplo, porque suas fibras possuem maior robustez. Além disso, a alta concentração de esteróides confirma a possível maturidade desses modelos, pois a composição da mielina é rica em colesterol, e está se desenvolve somente no período perinatal, ou seja, fases mais desenvolvidas. Processos relacionadas ao estresse celular estarem mais expressas em relação a 60 dias e proteínas oxidativas menos expressas do que em 45 dias, explica suas características mais desenvolvidas, pois indica diferenciação até uma condição mais atenuada de estresse, como observadas em 60 e 75 dias de diferenciação, no estudo do desenvolvimento neural.

Genes relacionados a má formação não aparecem modulados em nossos dados, no entanto, genes que possuem relação direta a orientação de axônios, como MAPK3, que regula netrina juntamente ao gene DCC, e o aumento de colesterol, principal molécula constituinte das jangadas lipídicas, que se liga ao gene DCC neste processo, estão regulados em relação a 45 dias e podem ser potenciais alvos de investigação, por outras técnicas biológicas complementares ou ortogonais, para elucidar a relação dessas moléculas nos fenótipos dessa desordem neurológica sob avaliação.

Esses resultados mostram que tais modelos abrem a possibilidade de investigar a complexidade morfológica, genética e molecular do desenvolvimento do cérebro humano e na origem de distúrbios, transtornos e doenças neurológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOITIZ, F.; MONTIEL, J. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 409–420, abr. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2003000400002&lng=en&tlng=en>.

AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass Spectrometry in Proteomics. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 2, p. 269–296, fev. 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr990076h>>.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature01511>>.

ALABED, Y. Z. et al. GSK3 Regulates Myelin-Dependent Axon Outgrowth Inhibition through CRMP4. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 16, p. 5635–5643, 21 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.6154-09.2010>>.

_____. Identification of CRMP4 as a Convergent Regulator of Axon Outgrowth Inhibition. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 7, p. 1702–1711, 14 fev. 2007. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5055-06.2007>>.

ALFONSO, J. et al. Diazepam Binding Inhibitor Promotes Progenitor Proliferation in the Postnatal SVZ by Reducing GABA Signaling. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 76–87, jan. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193459091100539X>>.

ALIOTA, M. T. et al. The wMel Strain of Wolbachia Reduces Transmission of Chikungunya Virus in Aedes aegypti. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004677, 28 abr. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004677>>.

ALKABIE, S. et al. SPARC expression by cerebral microvascular endothelial cells in vitro and its influence on blood-brain barrier properties. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 225, 31 dez. 2016. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0657-9>>.

ALLEN, J. A.; HALVERSON-TAMBOLI, R. A.; RASENICK, M. M. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 128–140, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2059>>.

ARLOTTA, P. et al. Ctip2 Controls the Differentiation of Medium Spiny Neurons and the Establishment of the Cellular Architecture of the Striatum. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 622–632, 16 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2986-07.2008>>.

ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ng0500_25>.

ASSIS-DE-LEMOES, G. et al. A Protocol to Study Mitochondrial Function in Human Neural Progenitors and iPSC-Derived Astrocytes. **Current Protocols in Toxicology**, v. 85, n. 1, 2 set. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cptx.97>>.

AYANLAJA, A. A. et al. Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, 28 jun. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00199/full>>.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 4, p. 939–965, 8 set. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-6203-4>>.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166–173, 24 mar. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cem.785>>.

BASHAW, G. J.; KLEIN, R. Signaling from Axon Guidance Receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a001941–a001941, 1 maio 2010. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a001941>>.

BATEMAN, A. et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D480–D489, 8 jan. 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D480/6006196>>.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617314502>>.

BEDESCHI, M. F. et al. Agenesis of the Corpus Callosum: Clinical and Genetic Study in 63 Young Patients. **Pediatric Neurology**, v. 34, n. 3, p. 186–193, mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899405004674>>.

BIAŁKOWSKA, K. et al. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6225, 28 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6225>>.

BIN, J. M. et al. Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death. **Cell Reports**, v. 12, n. 7, p. 1099–1106, ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124715007883>>.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.

Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602412>>.

BRENNAN, L. J. et al. The Endosymbiont *Wolbachia pipientis* Induces the Expression of Host Antioxidant Proteins in an *Aedes albopictus* Cell Line. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2083, 7 maio 2008. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002083>>.

BROWN, J. P. et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cne.10874>>.

BROWNSTEIN, J. .; HETT, E.; O'NEILL, S. . The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, n. 1, p. 24–29, set. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002220110300082X>>.

BRYANT, J. D. et al. Deletion of the neural tube defect–associated gene disrupts one-carbon and central energy metabolism in mouse embryos. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 16, p. 5821–5833, abr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820409378>>.

BUTLER, D. Zika virus: Brazil's surge in small-headed babies questioned by report. **Nature**, v. 530, n. 7588, p. 13–14, 4 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature.2016.19259>>.

BYSTRON, I.; BLAKEMORE, C.; RAKIC, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 110–122, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2252>>.

CAGNETTA, R. et al. Rapid Cue-Specific Remodeling of the Nascent Axonal Proteome. **Neuron**, v. 99, n. 1, p. 29–46.e4, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318304720>>.

CALVO, E. et al. Alboserpin, a Factor Xa Inhibitor from the Mosquito Vector of Yellow Fever, Binds Heparin and Membrane Phospholipids and Exhibits Antithrombotic Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 32, p. 27998–28010, ago. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820575170>>.

CAMINATI, G.; PROCACCI, P. Mounting evidence of FKBP12 implication in neurodegeneration. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 12, p. 2195, 2020. Disponível em: <<http://www.nrronline.org/text.asp?2020/15/12/2195/284980>>.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, out. 2015. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0847_article.htm>.

CASAS, B. S. et al. hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 48, 22 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41398-018-0095-9>>.

CHARNAY, Y. et al. Clusterin expression during fetal and postnatal CNS

development in mouse. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 714–724, ago. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452208008919>>.

CHEON, H.-M. et al. Regulation of Lipid Metabolism Genes, Lipid Carrier Protein Lipophorin, and Its Receptor during Immune Challenge in the Mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8426–8435, mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819565425>>.

CHIARADIA, I.; LANCASTER, M. A. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 1496–1508, 2 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41593-020-00730-3>>.

CHILTON, J. K. Molecular mechanisms of axon guidance. **Developmental Biology**, v. 292, n. 1, p. 13–24, abr. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160605009437>>.

CHISENHALL, D. M. et al. Effect of Dengue-2 Virus Infection on Protein Expression in the Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 431–437, 5 mar. 2014. Disponível em: <<https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.13-0412>>.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 3 mar. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004543>>.

CHOY, M. M.; SESSIONS, O. M.; et al. Production of Infectious Dengue Virus in *Aedes aegypti* Is Dependent on the Ubiquitin Proteasome Pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004227, 13 nov. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004227>>.

CHOY, M. M.; ZHANG, S. L.; et al. Proteasome Inhibition Suppresses Dengue Virus Egress in Antibody Dependent Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004058, 13 nov. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004058>>.

CHRISTIAN, C. A. et al. Endogenous Positive Allosteric Modulation of GABAA Receptors by Diazepam binding inhibitor. **Neuron**, v. 78, n. 6, p. 1063–1074, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313003577>>.

CODEÇO, C. T. et al. Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House Index with Four Alternative Traps. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003475, 10 fev. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003475>>.

COLLINS, S. J.; HAIGH, C. L. Simplified Murine 3D Neuronal Cultures for Investigating Neuronal Activity and Neurodegeneration. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 75, n. 1, p. 3–13, 28 mar. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12013-016-0768-z>>.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES III, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991–1000, 12 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature06525>>.

CUI, Y. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Chikungunya Virus-Infected *Aedes aegypti* Reveals Proteome Modulations Indicative of Persistent Infection. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 6, p. 2443–2456, 5 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c00173>>.

DA ROCHA FERNANDES, M. et al. The Modulation of the Symbiont/Host Interaction between *Wolbachia pipientis* and *Aedes fluviatilis* Embryos by Glycogen Metabolism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98966, 13 jun. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098966>>.

DA SILVEIRA, I. D. et al. Zika Virus Infection Produces a Reduction on *Aedes aegypti* Lifespan but No Effects on Mosquito Fecundity and Oviposition Success. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 18 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.03011/full>>.

DA SILVEIRA PAULSEN, B. et al. Altered Oxygen Metabolism Associated to Neurogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from a Schizophrenic Patient. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 7, p. 1547–1559, jul. 2012. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/full/10.3727/096368911X600957>>.

DAS GUPTA, S. et al. Dynamics of clusterin protein expression in the brain and plasma following experimental traumatic brain injury. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20208, 27 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-56683-6>>.

DE KUMAR, B. et al. *Hoxa1* targets signaling pathways during neural differentiation of ES cells and mouse embryogenesis. **Developmental Biology**, v. 432, n. 1, p. 151–164, dez. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160617305365>>.

DHAWAN, R. et al. Data from salivary gland proteome analysis of female *Aedes aegypti* Linn. **Data in Brief**, v. 13, p. 274–277, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352340917302251>>.

DI GIOVANNANTONIO, L. G. et al. *Otx2* cell-autonomously determines dorsal mesencephalon versus cerebellum fate independently of isthmus organizing activity. **Development**, v. 141, n. 2, p. 377–388, 15 jan. 2014. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.102954>>.

DI LULLO, E.; KRIEGSTEIN, A. R. The use of brain organoids to investigate neural development and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 573–584, 7 out. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn.2017.107>>.

DIAGNE, C. T. et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 492, 2 dez. 2015. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1231-2>>.

DICK, G. W. .; KITCHEN, S. .; HADDOW, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952. Disponível em: <[https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(52)90042-4)>.

DICKSON, B. J. Molecular Mechanisms of Axon Guidance. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1959–1964, 6 dez. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1072165>>.

DJURIC, U. et al. Spatiotemporal Proteomic Profiling of Human Cerebral Development. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 9, p. 1548–1562, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535947620323501>>.

DOMINICI, C. et al. Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. **Nature**, v. 545, n. 7654, p. 350–354, 26 maio 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature22331>>.

DONAHOO, A.-L. S.; RICHARDS, L. J. Understanding the Mechanisms of Callosal Development Through the Use of Transgenic Mouse Models. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 16, n. 3, p. 127–142, set. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1071909109000473>>.

DU, P. et al. An Intermediate Pluripotent State Controlled by MicroRNAs Is Required for the Naive-to-Primed Stem Cell Transition. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 6, p. 851–864.e5, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590918302157>>.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>>.

DUSHNIK-LEVINSON, M.; BENVENISTY, N. Embryogenesis in vitro: Study of Differentiation of Embryonic Stem Cells. **Neonatology**, v. 67, n. 2, p. 77–83, 1995. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/244147>>.

DUTRA, H. L. C. et al. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian Aedes aegypti Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 6, p. 771–774, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816301573>>.

ECCHER, M. Corpus Callosum. **Encycl. Neurol. Sci.** [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 867–868. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851574011374>>.

EDWARDS, T. J. et al. Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes. **Brain**, v. 137, n. 6, p. 1579–1613, jun. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awt358>>.

EL-BACHA, T.; DA POIAN, A. T. Virus-induced changes in mitochondrial

bioenergetics as potential targets for therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 1, p. 41–46, jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272512003329>>.

ENOMOTO, T. et al. Bcl11b/Ctip2 Controls the Differentiation of Vomeronasal Sensory Neurons in Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 28, p. 10159–10173, 13 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1245-11.2011>>.

FALLET-BIANCO, C. et al. Mutations in tubulin genes are frequent causes of various foetal malformations of cortical development including microlissencephaly. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n. 1, p. 69, 25 dez. 2014. Disponível em: <<http://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/2051-5960-2-69>>.

FALLON, A. M.; WITTHUHN, B. A. Proteasome activity in a naïve mosquito cell line infected with Wolbachia pipientis wAlbB. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 45, n. 8, p. 460–466, 19 set. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11626-009-9193-6>>.

FAME, R. M.; MACDONALD, J. L.; MACKLIS, J. D. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 1, p. 41–50, jan. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223610001475>>.

FAN, G.-C. Role of Heat Shock Proteins in Stem Cell Behavior. [S.l: s.n.], 2012. p. 305–322. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123984593000149>>.

FERNANDES, R. S. et al. Culex quinquefasciatus from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004993, 6 set. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004993>>.

FITZGERALD, K. A.; KAGAN, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. **Cell**, v. 180, n. 6, p. 1044–1066, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286742030218X>>.

FOLMES, C. D. L. et al. Metabolic Plasticity in Stem Cell Homeostasis and Differentiation. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 5, p. 596–606, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590912005838>>.

FORCET, C. et al. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 443–447, 1 maio 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature748>>.

FORD, S. A. et al. Artificial Selection Finds New Hypotheses for the Mechanism of Wolbachia-Mediated Dengue Blocking in Mosquitoes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 7 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01456/full>>.

FOSTER, E. M. et al. Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 28 fev. 2019.

Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00164/full>>.

FOUNTAIN, M. D. et al. Pathogenic variants in USP7 cause a neurodevelopmental disorder with speech delays, altered behavior, and neurologic anomalies. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1797–1807, 25 ago. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41436-019-0433-1>>.

FRANTZ, G. et al. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 5725–5740, 1 out. 1994. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.14-10-05725.1994>>.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, v. 352, n. 6287, p. 816–818, 13 maio 2016. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaf6116>>.

GARCEZ, Patricia P. et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40780, 23 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep40780>>.

GARCÍA-DEL PORTILLO, F. Building peptidoglycan inside eukaryotic cells: A view from symbiotic and pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 613–626, 17 mar. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.14452>>.

GARCIA, G. de A. et al. Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0007023, 8 jan. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007023>>.

GAVALAS, A. Neuronal defects in the hindbrain of *Hoxa1*, *Hoxb1* and *Hoxb2* mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. **Development**, v. 130, n. 23, p. 5663–5679, 1 dez. 2003. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.00802>>.

GENARO-MATTOS, T. C. et al. Cholesterol Biosynthesis and Uptake in Developing Neurons. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 3671–3681, 21 ago. 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.9b00248>>.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: [s.n.], 2019.

GIRALDO-CALDERÓN, G. I. et al. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D707–D713, 28 jan. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D707/2437683>>.

GLEESON, J. G. et al. Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 257–271, jun. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627300807783>>.

GORITZ, C.; MAUCH, D. H.; PFRIEGER, F. W. Multiple mechanisms mediate

cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 190–201, jun. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104474310500028X>>.

GOTO-SILVA, L. et al. Computational fluid dynamic analysis of physical forces playing a role in brain organoid cultures in two different multiplex platforms. **BMC Developmental Biology**, v. 19, n. 1, p. 3, 7 dez. 2019. Disponível em: <<https://bmcddevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12861-019-0183-y>>.

GUIRLAND, C. et al. Lipid Rafts Mediate Chemotropic Guidance of Nerve Growth Cones. **Neuron**, v. 42, n. 1, p. 51–62, abr. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627304001576>>.

GUIRLAND, C.; ZHENG, J. Q. Membrane Lipid Rafts and Their Role in Axon Guidance. **Axon Growth Guid.** New York, NY: Springer New York, [s.d.]. p. 144–154. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-76715-4_11>.

GUO, J. et al. Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase blocks Zika virus infection in mice. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 380, 15 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s42003-020-1109-8>>.

GUO, X. et al. Accelerated Metabolite Levels of Aerobic Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway Are Required for Efficient Replication of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus in Chinese Perch Brain Cells. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 440, 2 set. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/9/9/440>>.

HANSBERG, W. et al. Chapter 15 Cell differentiation as a response to oxidative stress. [S.l: s.n.], 2008. p. 235–257. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0275028708800574>>.

HAYBAECK, J. et al. Expression of Nogo-A Is Decreased with Increasing Gestational Age in the Human Fetal Brain. **Developmental Neuroscience**, v. 34, n. 5, p. 402–416, 2012. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/343143>>.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, 22 dez. 2015. Disponível em: <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-015-0611-3>>.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55–58, 29 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e1.htm>>.

HÉRINCS, Z. et al. ACC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 8, p. 1687–1692, 15 abr. 2005. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jcs/article/118/8/1687/28745/ACC-association-with-lipid-rafts-is-required-for>>.

HERNAIZ-LLORENS, M. et al. One Raft to Guide Them All, and in Axon Regeneration Inhibit Them. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 5009, 8 maio 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422->

0067/22/9/5009>.

HERRING, S. K. et al. Brain clusterin protein isoforms and mitochondrial localization. **eLife**, v. 8, 18 nov. 2019. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/48255>>.

HERTZ, N. T. et al. Neuronally Enriched RUFY3 Is Required for Caspase-Mediated Axon Degeneration. **Neuron**, v. 103, n. 3, p. 412- 422.e4, ago. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627319304830>>.

HOFFMANN, A. A. et al. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454–457, 24 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature10356>>.

HOLT, R. A. et al. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito Anopheles gambiae. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 129–149, 4 out. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1076181>>.

HONG, K. et al. A Ligand-Gated Association between Cytoplasmic Domains of UNC5 and ACC Family Receptors Converts Netrin-Induced Growth Cone Attraction to Repulsion. **Cell**, v. 97, n. 7, p. 927–941, jun. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400808041>>.

HONG, W. et al. Nicotinamide Mononucleotide: A Promising Molecule for Therapy of Diverse Diseases by Targeting NAD⁺ Metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 28 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00246/full>>.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 1, p. 1–13, jan. 2009a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn923>>.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 18 jan. 2009b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2008.211>>.

HUSSAIN, G. et al. Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 26, 25 dez. 2019. Disponível em: <<https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-019-0965-z>>.

ITSKOVITZ-ELDOR, J. et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 88–95, 1 fev. 2000. Disponível em: <<https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1007/BF03401776>>.

JACKSON SNIPES, G.; SUTER, U. Cholesterol and Myelin. [S.l: s.n.], 1997. p. 173–204. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-5901-6_7>.

JAHN, R.; FASSHAUER, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 201–207, 10 out. 2012. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/nature11320>>.

JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 279–331, 1 nov. 1997. Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0033583597003399/type/journal_article>.

JARJOUR, A. A. et al. Netrin-1 Is a Chemorepellent for Oligodendrocyte Precursor Cells in the Embryonic Spinal Cord. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 3735–3744, 1 maio 2003. Disponível em:

<<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03735.2003>>.

JASSAL, B. et al. The reactome pathway knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, 6 nov. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkz1031/5613674>>.

JIANG, L. et al. Ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7)-mediated deubiquitination of the histone deacetylase SIRT7 regulates gluconeogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 32, p. 13296–13311, ago. 2017. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820385562>>.

JONES, S. Clusterin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 5, p. 427–431, maio 2002. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272501001558>>.

JONES, E. V. et al. Astrocytes Control Glutamate Receptor Levels at Developing Synapses through SPARC- Integrin Interactions. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 4154–4165, 16 mar. 2011. Disponível em:

<<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4757-10.2011>>.

JONES, Emma V. et al. SPARC and GluA1-Containing AMPA Receptors Promote Neuronal Health Following CNS Injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, 1 fev. 2018. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2018.00022/full>>.

JONES, Emma V.; BOUVIER, D. S. Astrocyte-Secreted Matricellular Proteins in CNS Remodelling during Development and Disease. **Neural Plasticity**, v. 2014, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/np/2014/321209/>>.

KALHAN, S.; PARIMI, P. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. **Seminars in Perinatology**, v. 24, n. 2, p. 94–106, abr. 2000. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146000500800257>>.

KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.1.27>>.

KANEHISA, Minoru et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 4 jan. 2017.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1092>>.

KEINO-MASU, K. et al. Deleted in Colorectal Cancer (ACC) Encodes a Netrin Receptor. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 175–185, out. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400813367>>.

KELAVA, I.; LANCASTER, M. A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. **Developmental Biology**, v. 420, n. 2, p. 199–209, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160616302196>>.

KENNEDY, T. E. et al. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. **Cell**, v. 78, n. 3, p. 425–435, ago. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867494904219>>.

KIDD, T. et al. Roundabout Controls Axon Crossing of the CNS Midline and Defines a Novel Subfamily of Evolutionarily Conserved Guidance Receptors. **Cell**, v. 92, n. 2, p. 205–215, jan. 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400809150>>.

KIM, J.; KOO, B.-K.; KNOBLICH, J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 571–584, 7 out. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41580-020-0259-3>>.

KIM, Y. H.; HEO, J. S.; HAN, H. J. High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v. 209, n. 1, p. 94–102, out. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.20706>>.

KINGSOLVER, M. B.; HUANG, Z.; HARDY, R. W. Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 4921–4936, dez. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283613006323>>.

KOH, C. et al. Dengue virus dominates lipid metabolism modulations in Wolbachia-coinfected *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 518, 18 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s42003-020-01254-z>>.

KUCUKDERELI, H. et al. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 32, p. E440–E449, 9 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1104977108>>.

KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W90–W97, 8 jul. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw377>>.

KUMAR, A. et al. Interplay between antioxidants in response to photooxidative stress in *Arabidopsis*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 160, p. 894–907, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158492031234X>>.

KUZMINA, N. V. et al. Protein-Lipid Interactions in Formation of Viral Envelopes.

Biophysical Journal, v. 118, n. 3, p. 523a, fev. 2020. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634951933807X>>.

LAKOMEK, N.-A. et al. Structural dynamics and transient lipid binding of synaptobrevin-2 tune SNARE assembly and membrane fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 18, p. 8699–8708, 30 abr. 2019. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1813194116>>.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. **Science**, v. 345, n. 6194, p. 1247125–1247125, 18 jul. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1247125>>.

LANCASTER, Madeline A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 373–379, 19 set. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature12517>>.

LEID, M. et al. CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. **Gene Expression Patterns**, v. 4, n. 6, p. 733–739, out. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567133X04000559>>.

LENNON, M. J. et al. Bcl11b—A Critical Neurodevelopmental Transcription Factor—Roles in Health and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 29 mar. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00089/full>>.

LI, F. et al. Identification and expression profiling of neuropeptides and neuropeptide receptor genes in *Atrijuglans hetaohei*. **Gene**, v. 743, p. 144605, jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111920302742>>.

LINTHICUM, K. J. et al. Dengue 3 virus distribution in the mosquito *Aedes aegypti*: an immunocytochemical study. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, n. 1, p. 87–92, jan. 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00086.x>>.

LLOYD-BURTON, S.; ROSKAMS, A. J. SPARC-like 1 (SC1) is a diversely expressed and developmentally regulated matricellular protein that does not compensate for the absence of SPARC in the CNS. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 12, p. 2575–2590, 15 ago. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cne.23029>>.

LUI, J. H.; HANSEN, D. V.; KRIEGSTEIN, A. R. Development and Evolution of the Human Neocortex. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 18–36, jul. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411007057>>.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92424, 27 mar. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092424>>.

MAHLEY, R. W. Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.

36, n. 7, p. 1305–1315, jul. 2016. Disponível em:
<<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.116.307023>>.

MAITIDUTTA, S.; CHEN, G.; MAITI, S. Tocopherol Moderately Induces the Expressions of Some Human Sulfotransferases, which are Activated by Oxidative Stress. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 78, n. 4, p. 439–446, 8 dez. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12013-020-00938-x>>.

MAKKI, N.; CAPECCHI, M. R. Hoxa1 lineage tracing indicates a direct role for Hoxa1 in the development of the inner ear, the heart, and the third rhombomere. **Developmental Biology**, v. 341, n. 2, p. 499–509, maio 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160610000990>>.

_____. Identification of novel Hoxa1 downstream targets regulating hindbrain, neural crest and inner ear development. **Developmental Biology**, v. 357, n. 2, p. 295–304, set. 2011. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001216061101102X>>.

MANE, N. R.; GAJARE, K. A.; DESHMUKH, A. A. Mild heat stress induces hormetic effects in protecting the primary culture of mouse prefrontal cerebrocortical neurons from neuropathological alterations. **IBRO Reports**, v. 5, p. 110–115, dez. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451830118300724>>.

MANESS, P. F.; SCHACHNER, M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn1827>>.

MANIVANNAN, J. et al. Dihydropyrimidinase-like 3 regulates the inflammatory response of activated microglia. **Neuroscience**, v. 253, p. 40–54, dez. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452213007112>>.

MARÃ-N-PADILLA, M. Human cerebral cortex Cajal-Retzius neuron: development, structure and function. A Golgi study. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, 27 fev. 2015. Disponível em:
<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnana.2015.00021/abstract>>.

MARSH, A. P. L. et al. ACC mutation update: Congenital mirror movements, isolated agenesis of the corpus callosum, and developmental split brain syndrome. **Human Mutation**, v. 39, n. 1, p. 23–39, jan. 2018. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1002/humu.23361>>.

MARSH, A. P. L. et al. Mutations in ACC cause isolated agenesis of the corpus callosum with incomplete penetrance. **Nature Genetics**, v. 49, n. 4, p. 511–514, 27 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng.3794>>.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; VÁZQUEZ-CALVO, Á.; SAIZ, J.-C. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 123–137, out. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782716300157>>.

MELO, A. S. de O. et al. Congenital Zika Virus Infection. **JAMA Neurology**, v. 73, n.

12, p. 1407, 1 dez. 2016. Disponível em:
<<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaneurol.2016.3720>>.

MERCADO, M. et al. Zika virus detection in amniotic fluid and Zika-associated birth defects. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 222, n. 6, p. 610.e1-610.e13, jun. 2020. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937820300132>>.

MEYER, G.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, M. The heterogeneity of human Cajal-Retzius neurons. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 76, p. 101–111, abr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952116303652>>.

MINTER, B. E. et al. Differential Effects of MitoVitE, α -Tocopherol and Trolox on Oxidative Stress, Mitochondrial Function and Inflammatory Signalling Pathways in Endothelial Cells Cultured under Conditions Mimicking Sepsis. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 195, 26 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/9/3/195>>.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. **Eng. Stem Cells**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 185–199. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/10_2008_45>.

MOMB, J. et al. Deletion of Mthfd1l causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 2, p. 549–554, 8 jan. 2013. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1211199110>>.

MOMB, Jessica; APPLING, D. R. Mitochondrial one-carbon metabolism and neural tube defects. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 8, p. 576–583, ago. 2014. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1002/bdra.23268>>.

MOREIRA, L. A. et al. A Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–1278, dez. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409015001>>.

MOREL, L. et al. Molecular and Functional Properties of Regional Astrocytes in the Adult Brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 36, p. 8706–8717, 6 set. 2017. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3956-16.2017>>.

MURILLO, J. R. et al. Mass spectrometry evaluation of a neuroblastoma SH-SY5Y cell culture protocol. **Analytical Biochemistry**, v. 559, p. 51–54, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269718304792>>.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887–1887, out. 2015. Disponível em:
<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-1125_article.htm>.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, jul. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615612739>>.

NAGESHAPPA, S. et al. Altered neuronal network and rescue in a human MECP2 duplication model. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 2, p. 178–188, 8 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/mp2015128>>.

NAKAMURA, F.; OHSHIMA, T.; GOSHIMA, Y. Collapsin Response Mediator Proteins: Their Biological Functions and Pathophysiology in Neuronal Development and Regeneration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 23 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2020.00188/full>>.

NIKOU EI, K.; MUÑOZ-MANCHADO, A. B.; HJERLING-LEFFLER, J. BCL11B/CTIP2 is highly expressed in GABAergic interneurons of the mouse somatosensory cortex. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 71, p. 1–5, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891061815300107>>.

NOWICKA, B. et al. The inhibitor-evoked shortage of tocopherol and plastoquinol is compensated by other antioxidant mechanisms in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to toxic concentrations of cadmium and chromium ions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 191, p. 110241, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651320300804>>.

NÚÑEZ, E. V.; DOMONT, G. B.; NOGUEIRA, F. C. S. iTRAQ-Based Shotgun Proteomics Approach for Relative Protein Quantification. [S.l: s.n.], 2017. p. 267–274. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6730-8_23>.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, jan. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.15831>>.

ORTH, M.; BELLOSTA, S. Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders. **Cholesterol**, v. 2012, p. 1–19, 17 out. 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/cholesterol/2012/292598/>>.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 839–845, out. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2236>>.

PAN, X. et al. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. E23–E31, 3 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116932108>>.

PARK, Y. et al. Three-dimensional, multifunctional neural interfaces for cortical spheroids and engineered assembloids. **Science Advances**, v. 7, n. 12, p. eabf9153, 17 mar. 2021. Disponível em: <<https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.abf9153>>.

PAUL, L. K. et al. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 287–299, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2107x>>.

_____. Developmental malformation of the corpus callosum: a review of typical callosal development and examples of developmental disorders with callosal involvement. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 3, n. 1, p. 3–27, 23 mar. 2011. Disponível em: <<http://jneurodevdisorders.biomedcentral.com/articles/10.1007/s11689-010-9059-y>>.

PERERA, R. et al. Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002584, 22 mar. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002584>>.

PETERSEN, M. T. et al. The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200766, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0200766>>.

PHILLIPS, D. R.; CLARK, K. D. Bombyx mori and *Aedes aegypti* form multi-functional immune complexes that integrate pattern recognition, melanization, coagulants, and hemocyte recruitment. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171447, 15 fev. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0171447>>.

PICKETT, B. E. et al. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D593–D598, jan. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr859>>.

PIPER, M. et al. Neuropilin 1-Sema Signaling Regulates Crossing of Cingulate Pioneering Axons during Development of the Corpus Callosum. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. suppl_1, p. i11–i21, jul. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhp027>>.

PODDAR, S. K. et al. Nicotinamide Mononucleotide: Exploration of Diverse Therapeutic Applications of a Potential Molecule. **Biomolecules**, v. 9, n. 1, p. 34, 21 jan. 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2218-273X/9/1/34>>.

POWELL, A. W. et al. Topography of Thalamic Projections Requires Attractive and Repulsive Functions of Netrin-1 in the Ventral Telencephalon. **PLoS Biology**, v. 6, n. 5, p. e116, 13 maio 2008. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0060116>>.

PRASANAN, P. et al. Human Mitochondrial C1-Tetrahydrofolate Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43178–43187, out. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820825976>>.

PREDEL, R. et al. Neuropeptidomics of the Mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 4, p. 2006–2015, 5 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr901187p>>.

PUELLES, E. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. **Development**, v. 131, n. 9, p. 2037–2048, 31 mar. 2004. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01107>>.

RANA, U. et al. Nogo-B receptor deficiency causes cerebral vasculature defects

during embryonic development in mice. **Developmental Biology**, v. 410, n. 2, p. 190–201, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160615300385>>.

RAUNIYAR, N.; YATES, J. R. Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 12, p. 5293–5309, 5 dez. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr500880b>>.

RAYBAUD, C. Corpus Callosum. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 445–459, ago. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1052514919300280>>.

REXER, T. et al. Enzymatic Synthesis of Glycans and Glycoconjugates. [S.l: s.n.], 2020. . Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/10_2020_148>.

RIBEIRO, J. M. C. et al. A Deep Insight into the Sialome of Male and Female Aedes aegypti Mosquitoes. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151400, 21 mar. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0151400>>.

ROHART, F. et al. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 11, p. e1005752, 3 nov. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>>.

ROHNE, P.; PROCHNOW, H.; KOCH-BRANDT, C. The CLU-files: disentanglement of a mystery. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/journals/bmc/7/1/article-p1.xml>>.

ROZICH, N. S.; BLAIR, A. B.; BURKHART, R. A. Organoids. **Precis. Med. Investig. Pract. Provid.** [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 123–129. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128191781000125>>.

RUIZ-PEREZ, D. et al. So you think you can PLS-DA? **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. S1, p. 2, 9 dez. 2020. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-3310-7>>.

RUSSELL, S. A.; BASHAW, G. J. Axon guidance pathways and the control of gene expression. **Developmental Dynamics**, v. 247, n. 4, p. 571–580, abr. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.24609>>.

SADLER, T. W. **Langman, embriologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SANDRA, K. et al. Highly efficient peptide separations in proteomicsPart 2: Bi- and multidimensional liquid-based separation techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 11–12, p. 1019–1039, 15 abr. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023209001421>>.

SCHELL-APACIK, C. C. et al. Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: Clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146A, n. 19, p. 2501–2511, 1 out. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.32476>>.

SCHMID, M. et al. Preparation of Mosquito Salivary Gland Extract and Intradermal Inoculation of Mice. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 14, 2017. Disponível em: <<https://bio-protocol.org/e2407>>.

SCHMID, R. S.; MANESS, P. F. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 18, n. 3, p. 245–250, jun. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438808000731>>.

SCHUBERT, O. T. et al. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1289–1294, 1 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2017.040>>.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 29 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e2.htm>>.

SCHWAB, M. E. Nogo and axon regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 1, p. 118–124, fev. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438804000054>>.

SERAFINI, T. et al. Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System. **Cell**, v. 87, n. 6, p. 1001–1014, dez. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740081795X>>.

SHIN, M. et al. Deletion of neural tube defect-associated gene Mthfd1l causes reduced cranial mesenchyme density. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 19, p. 1520–1534, 15 nov. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bdr2.1591>>.

SHOU, Y. et al. The Application of Brain Organoids: From Neuronal Development to Neurological Diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 22 out. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.579659/full>>.

SHRINET, J.; BHAVESH, N.; SUNIL, S. Understanding Oxidative Stress in Aedes during Chikungunya and Dengue Virus Infections Using Integromics Analysis. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 314, 9 jun. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/6/314>>.

SIDHAYE, J.; KNOBLICH, J. A. Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. **Cell Death & Differentiation**, v. 28, n. 1, p. 52–67, 1 jan. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41418-020-0566-4>>.

SIEBER-BLUM, M. et al. Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 32, n. 1–2, p. 67–81, maio 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743106000467>>.

SIMEONE, A. Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian

brain. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 23, p. 6790–6798, 1 dez. 1998. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/17.23.6790>>.

SIMON, R. et al. Structure-function integrity of the adult hippocampus depends on the transcription factor Bcl11b/Ctip2. **Genes, Brain and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 405–419, abr. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/gbb.12287>>.

SIMON, Ruth et al. A dual function of Bcl11b/Ctip2 in hippocampal neurogenesis. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 13, p. 2922–2936, 29 jun. 2012. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2012.142>>.

SIMON, Ruth; WIEGREFFE, C.; BRITSCH, S. Bcl11 Transcription Factors Regulate Cortical Development and Function. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, 8 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2020.00051/full>>.

SIRENKO, O. et al. Functional evaluation of neurotoxic compounds using human iPSC-derived neuronal 3D cultures. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 99, p. 106595, set. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871919303041>>.

SOCHACKI, J. et al. Generation of urine iPS cell lines from patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) using a non-integrative method. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 102–106, jul. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506116300563>>.

SONG, W.; ZINSMAIER, K. E. Endophilin and Synaptojanin Hook Up to Promote Synaptic Vesicle Endocytosis. **Neuron**, v. 40, n. 4, p. 665–667, nov. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627303007268>>.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 33, p. 20802–20809, ago. 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818489181>>.

STERKEL, M. et al. Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. **Current Biology**, v. 26, n. 16, p. 2188–2193, ago. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982216306649>>.

SÜDHOF, T. C. The Molecular Machinery of Neurotransmitter Release (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 47, p. 12696–12717, 17 nov. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201406359>>.

SUN, T.; HEVNER, R. F. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 217–232, 20 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn3707>>.

SUPEK, F. et al. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21800, 18 jul. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021800>>.

SUTER, T. A. C. S.; JAWORSKI, A. Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system. **Science**, v. 365, n. 6456, p. eaaw8231, 30 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaw8231>>.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, nov. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407014717>>.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, ago. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009767>>.

TANG, H.; WONG-STAAAL, F. Specific Interaction between RNA Helicase A and Tap, Two Cellular Proteins That Bind to the Constitutive Transport Element of Type D Retrovirus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32694–32700, out. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820891522>>.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.282.5391.1145>>.

TOI, A.; MALINGER, G. Cortical Development and Disorders. **Obstet. Imaging Fetal Diagnosis Care**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 174-184.e1. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032344548100036X>>.

TONON, M.-C. et al. Endozepines and their receptors: Structure, functions and pathophysiological significance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 208, p. 107386, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725819301172>>.

TROUPIN, A. et al. A novel mosquito ubiquitin targets viral envelope protein for degradation and reduces virion production during dengue virus infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 9, p. 1898–1909, set. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416516301751>>.

TSUTIYA, A. et al. Human CRMP4 mutation and disrupted Crmp4 expression in mice are associated with ASD characteristics and sexual dimorphism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16812, 1 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-16782-8>>.

TSUTIYA, A.; OHTANI-KANEKO, R. Postnatal alteration of collapsin response mediator protein 4 mRNA expression in the mouse brain. **Journal of Anatomy**, v. 221, n. 4, p. 341–351, out. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7580.2012.01544.x>>.

TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. **Nature**, v. 353, n. 6343, p. 440–442, out. 1991. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/353440a0>>.

TURLEY, A. P. et al. Wolbachia Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 9, p. e516, 15 set. 2009. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000516>>.

UJJAINWALA, A. L. et al. Differential impacts on multiple forms of spatial and contextual memory in diazepam binding inhibitor knockout mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 97, n. 6, p. 683–697, 25 jun. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.24393>>.

UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 8 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D506/5160987>>.

VAN BATTUM, E. Y.; BRIGNANI, S.; PASTERKAMP, R. J. Axon guidance proteins in neurological disorders. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 5, p. 532–546, maio 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442214702571>>.

VAN DEN HURK, A. F. et al. Impact of Wolbachia on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1892, 1 nov. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001892>>.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. Glucose metabolism in the developing brain. **Seminars in Perinatology**, v. 24, n. 2, p. 107–115, abr. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146000500800269>>.

VARADARAJAN, S. G. et al. Netrin1 Produced by Neural Progenitors, Not Floor Plate Cells, Is Required for Axon Guidance in the Spinal Cord. **Neuron**, v. 94, n. 4, p. 790–799.e3, maio 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317301903>>.

VIED, C. M. et al. A multi-resource data integration approach: identification of candidate genes regulating cell proliferation during neocortical development. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 21 ago. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00257/abstract>>.

VINCENT, A. J.; LAU, P. W.; ROSKAMS, A. J. SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 5, p. 1449–1462, maio 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.21495>>.

WALKER, T. et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450–453, 24 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature10355>>.

WALKUP, A. S.; APPLING, D. R. Enzymatic characterization of human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, n. 2, p. 196–205, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986105003474>>.

WANG, L. et al. Isoform-specific localization of Nogo protein in the optic pathway of mouse embryos. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 11, p. 2322–2334, 1 ago. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cne.23953>>.

WANG, X. et al. The diversity of pattern recognition receptors (PRRs) involved with insect defense against pathogens. **Current Opinion in Insect Science**, v. 33, p. 105–110, jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214574519300094>>.

WANG, Y. et al. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 2, p. 191–198, 7 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb2902>>.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1090–1094, 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.11501601185>>.

WASINPIYAMONGKOL, L. et al. Blood-feeding and immunogenic Aedes aegypti saliva proteins. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 10, p. 1906–1916, 12 maio 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900626>>.

WATANABE, S. et al. Synaptojanin and Endophilin Mediate Neck Formation during Ultrafast Endocytosis. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1184–1197.e6, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318304732>>.

WEI, Z. et al. Rufy3, a protein specifically expressed in neurons, interacts with actin-bundling protein Fascin to control the growth of axons. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, n. 5, p. 678–692, set. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.12740>>.

WHITE, M. K. et al. Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Annals of Neurology**, v. 80, n. 4, p. 479–489, out. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.24748>>.

WHITE, P. M. et al. Reliance of Wolbachia on High Rates of Host Proteolysis Revealed by a Genome-Wide RNAi Screen of Drosophila Cells. **Genetics**, v. 205, n. 4, p. 1473–1488, 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/genetics/article/205/4/1473/6066431>>.

WILKINS, M. R. et al. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 61–65, 1 jan. 1996. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt0196-61>>.

WOODRUFF, G. et al. Screening for modulators of neural network activity in 3D human iPSC-derived cortical spheroids. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0240991, 22 out. 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0240991>>.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The Aedes aegypti Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 7, p. e1000098, 4 jul. 2008. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000098>>.

XIE, F.; SMITH, R. D.; SHEN, Y. Advanced proteomic liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1261, p. 78–90, out. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312010369>>.

YAMASHITA, N. et al. Collapsin Response Mediator Protein 1 Mediates Reelin Signaling in Cortical Neuronal Migration. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 51, p. 13357–13362, 20 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4276-06.2006>>.

YAMASHITA, Naoya; GOSHIMA, Y. Collapsin Response Mediator Proteins Regulate Neuronal Development and Plasticity by Switching Their Phosphorylation Status. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 234–246, 18 abr. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-012-8242-4>>.

YANG, J. et al. Neural differentiation and the attenuated heat shock response. **Brain Research**, v. 1203, p. 39–50, abr. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000689930800228X>>.

YASUHARA, N.; OKA, M.; YONEDA, Y. The role of the nuclear transport system in cell differentiation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 5, p. 590–599, jul. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952109001025>>.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 49–79, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>>.

YIP, J. et al. Cerebral Gluconeogenesis and Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 4 jan. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00521/full>>.

ZHANG, J. et al. Metabolism in Pluripotent Stem Cells and Early Mammalian Development. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 332–338, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413118300573>>.

ZHANG, S.-C. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1129–1133, 1 dez. 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nbt1201-1129>>.

ZHANG, X. et al. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 664, n. 2, p. 101–113, abr. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010001613>>.

ZHANG, Y. et al. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 10 abr. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr3003533>>.

ZHOU, T. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. **Nature Protocols**, v. 7, n. 12, p. 2080–2089, 8 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2012.115>>.

ZHOU, Y. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1523, 3 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-019-09234-6>>.

ANEXO(S)

Anexo 1: Lista de proteínas diferenciais do estudo da diferenciação de neuroesferas com 10 dias. (continua)

Gene	Acesso Uniprot	Descrição	10D/3D	-Log p-value	- Log Fold Change
TUBA1A	Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	+	1,34648	0,5389929
TUBB2B	Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	+	1,729803	0,9982142
TUBB2A	Q13885	Tubulin beta-2A chain	+	2,554588	1,2105036
MAP1B	P46821	Microtubule-associated protein 1B	+	1,80786	0,5026798
TUBB3	Q13509	Tubulin beta-3 chain	+	2,009463	1,0327172
TUBB4A	P04350	Tubulin beta-4A chain	+	2,824789	1,7275519
ATP5B	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	+	1,823203	0,7276788
NEFM	P07197	Neurofilament medium polypeptide	+	3,747268	1,3204818
INA	Q16352	Alpha-internexin	+	2,22049	1,4791179
DPYSL3	Q14195	Dihydropyrimidinase-related protein 3	+	1,513745	0,5741365
EEF1A2	Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	+	2,162829	1,1068678
ENO2	P09104	Gamma-enolase	+	2,838022	1,2492344
NEFL	P07196	Neurofilament light polypeptide	+	2,090292	1,3954909
MAP2	P11137	Microtubule-associated protein 2	+	3,025739	1,0212979
GDI1	P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	+	3,260409	0,9950235
CRMP1	Q14194	Dihydropyrimidinase-related protein 1	+	1,780792	0,7486424
VAT1	Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	+	2,354369	0,6585445
LMNB2	Q03252	Lamin-B2	+	1,823256	0,5403526
DBN1	Q16643	Drebrin	+	3,164719	0,5270433
RTN4	Q9NQC3	Reticulon-4	+	2,818725	0,7185946
ATP6V1A	P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	+	2,832142	0,785044
KIF5C	O60282	Kinesin heavy chain isoform 5C	+	1,97978	0,5529776
KLC1	Q07866	Kinesin light chain 1	+	1,946039	0,5653644
UCHL1	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	+	2,725493	0,5743346
YWHAG	P61981	14-3-3 protein gamma	+	2,130711	0,9504213
RCN1	Q15293	Reticulocalbin-1	+	2,065528	0,5329113
RCN2	Q14257	Reticulocalbin-2	+	3,297685	0,5688252
IRGQ	Q8WZA9	Immunity-related GTPase family Q protein	+	3,049603	0,6573365
DYNC1L1	Q9Y6G9	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	+	3,239649	0,5131509
NCAM1	P13591	Neural cell adhesion molecule 1	+	3,120121	1,4208927
LRP1	Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	+	2,204496	0,5560503
CLU	P10909	Clusterin	+	3,02188	1,8724811
ATP6V1B2	P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	+	2,763098	0,5693355
ATP1A3	P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	+	3,053067	1,2349746
ALDH2	P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	+	2,910993	0,5279484
DYNC1I2	Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	+	1,99686	0,7539921
DYNC1L2	O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	+	3,247852	0,7345147
STMN1	P16949	Stathmin	+	2,367945	0,5658236
BASP1	P80723	Brain acid soluble protein 1	+	2,383398	1,4919252
DCTN2	Q13561	Dynactin subunit 2	+	3,159161	0,5628843
PRKAR2A	P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	+	2,281282	0,5875626
PPP2CA	P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	+	1,92353	0,5823708
GNAI1	P63096	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	+	2,93224	1,1187534
CEP170	Q5SW79	Centrosomal protein of 170 kDa	+	2,063453	0,5253637
PPP1R7	Q15435	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	+	2,234498	0,7119911
EPS15L1	Q9UBC2	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	+	2,836091	0,5057473
SNCG	O76070	Gamma-synuclein	+	2,92281	1,2424908
NOVA2	Q9UNW9	RNA-binding protein Nova-2	+	1,432939	0,5753269
SEPT6	Q14141	Septin-6	+	3,132907	0,9506495
ATP2B4	P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	+	2,002329	0,6037841
ERLIN2	O94905	Erlin-2	+	1,927328	0,5414946
KLC4	Q9NSK0	Kinesin light chain 4	+	1,884653	0,5245144
CTSD	P07339	Cathepsin D	+	2,491243	0,6417122
GPHN	Q9NQX3	Gephyrin	+	2,615235	0,5032141

PRDX5	P30044	Peroxisredoxin-5, mitochondrial	+	1,701333	0,6250463
ERP29	P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	+	1,645054	0,5247669
SCRN1	Q12765	Secernin-1	+	2,69487	0,7686806
MYO5A	Q9Y411	Unconventional myosin-Va	+	2,779176	0,7363381
VCAN	P13611	Versican core protein	+	2,623613	0,7107394
G3BP2	Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	+	1,624544	0,5682256
RUFY3	Q7L099	Protein RUFY3	+	3,163552	1,1104968
ELAVL3	Q14576	ELAV-like protein 3	+	2,833592	0,9847941
GRIPAP1	Q4V328	GRIP1-associated protein 1	+	2,227824	0,5888791
PRKAR2B	P31323	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	+	2,737263	1,0091419
CTNNA2	P26232	Catenin alpha-2	+	2,538905	0,8690348
CLIP2	Q9UDT6	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	+	2,659206	0,6548884
PAK3	Q75914	Serine/threonine-protein kinase PAK 3	+	2,330809	0,5382645
SEPT5	Q99719	Septin-5	+	2,609722	1,4313414
NOVA1	P51513	RNA-binding protein Nova-1	+	2,817797	1,1028545
ANK3	Q12955	Ankyrin-3	+	1,811794	0,5277827
ADD2	P35612	Beta-adducin	+	2,409696	0,6398962
DECR1	Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	+	3,004268	0,6284642
PCMT1	P22061	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	+	1,886354	0,708714
NAPB	Q9H115	Beta-soluble NSF attachment protein	+	3,409255	1,2333951
DNM1	Q05193	Dynamin-1	+	2,247617	1,2234325
IRF2BPL	Q9H1B7	Probable E3 ubiquitin-protein ligase IRF2BPL	+	2,065135	0,6067543
ANK2	Q01484	Ankyrin-2	+	2,302877	0,5358331
PFN2	P35080	Profilin-2	+	2,194981	0,5199099
TNC	P24821	Tenascin	+	2,313633	0,7853363
SUCLA2	Q9P2R7	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	+	2,745374	0,6421998
GAP43	P17677	Neuromodulin	+	2,757814	1,4774539
	Q96SB3	Neurabin-2	+	1,429757	0,7247069
GNAO1	P09471	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	+	2,557635	1,2053213
DBNL	Q9UJU6	Drebrin-like protein	+	1,36251	0,5413806
HIST1H1D	P16402	Histone H1.3	+	1,858382	0,74368
TPP1	O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	+	1,644689	0,7839909
ASAH1	Q13510	Acid ceramidase	+	2,759452	1,0326715
UBQLN2	Q9UHD9	Ubiquilin-2	+	1,31911	0,6638868
AKR1C1	Q04828	Aldo-keto reductase family 1 member C1	+	2,293675	1,2767653
STXBP1	P61764	Syntaxin-binding protein 1	+	2,63066	0,8261616
NRCAM	Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	+	2,039144	0,5673096
L1CAM	P32004	Neural cell adhesion molecule L1	+	2,78026	1,1787524
SEPT3	Q9UH03	Neuronal-specific septin-3	+	3,242536	0,8290536
AMPH	P49418	Amphiphysin	+	2,11239	0,6985106
RANBP6	O60518	Ran-binding protein 6	+	2,100137	0,5488336
AK1	P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	+	2,555178	0,954129
SCP2	P22307	Non-specific lipid-transfer protein	+	2,210981	0,5756414
STRN4	Q9NRL3	Striatin-4	+	2,014069	0,5424724
SNAP25	P60880	Synaptosomal-associated protein 25	+	3,180416	1,3295753
STMN2	Q93045	Stathmin-2	+	2,637252	1,6536326
AKR1C2	P52895	Aldo-keto reductase family 1 member C2	+	1,978552	1,2279799
STAM	Q92783	Signal transducing adapter molecule 1	+	1,705989	0,6089966
GNS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	+	1,956092	0,5707474
AP3B2	Q13367	AP-3 complex subunit beta-2	+	2,455407	0,9892678
COX5A	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	+	2,070906	0,5754058
SH3GLB1	Q9Y371	Endophilin-B1	+	1,640905	0,5505707
VAMP2	P63027	Vesicle-associated membrane protein 2	+	1,710095	0,6494246
SNCA	P37840	Alpha-synuclein	+	1,671546	0,6268191
MAPRE2	Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	+	1,388287	0,9647357
GPX1	P07203	Glutathione peroxidase 1	+	1,788274	0,6108327
TERF2IP	Q9NYB0	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	+	2,74153	0,6072462
ATP5J	P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	+	1,596582	0,5275409
MAP6	Q96JE9	Microtubule-associated protein 6	+	1,482386	0,6055927
NADK2	Q4G0N4	NAD kinase 2, mitochondrial	+	1,660514	0,5894935
PRCP	P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	+	4,014269	0,6763177
ATP6V1E1	P36543	V-type proton ATPase subunit E 1	+	3,255889	0,7278416
SNAP91	O60641	Clathrin coat assembly protein AP180	+	2,215764	1,5731018
HSPA12A	O43301	Heat shock 70 kDa protein 12A	+	2,636013	0,9698308
HTRA2	O43464	Serine protease HTRA2, mitochondrial	+	2,334238	0,5345404
STX12	Q86Y82	Syntaxin-12	+	2,409056	1,0874057

CXADR	P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor	+	1,840347	0,9815924
ADGRL3	Q9HAR2	Adhesion G protein-coupled receptor L3	+	3,247489	0,9316993
STX7	O15400	Syntaxin-7	+	2,143719	0,8174424
RAB6B	Q9NRW1	Ras-related protein Rab-6B	+	3,469045	0,7191973
FBNP1L	Q5TON5	Formin-binding protein 1-like	+	1,616101	0,5429554
MAPT	P10636	Microtubule-associated protein tau	+	2,22915	1,3021204
OXCT1	P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	+	2,225803	0,51893
FAHD1	Q6P587	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	+	1,972537	0,640341
	Q5T5U3	Rho GTPase-activating protein 21	+	2,31145	0,5097358
APOE	P02649	Apolipoprotein E	+	2,243025	0,7497222
UBE2V2	Q15819	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	+	1,976595	0,6356835
CCDC90B	Q9GZT6	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial	+	1,340923	0,6046357
ACTL6B	O94805	Actin-like protein 6B	+	2,358727	1,1064768
PHYHIPL	Q96FC7	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like	+	2,663837	0,5648189
TMOD2	Q9NZR1	Tropomodulin-2	+	2,437961	1,0972769
ADGRG1	Q9Y653	Adhesion G-protein coupled receptor G1	+	1,806547	0,5758471
UQCRB	P14927	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	+	2,747937	0,6616945
NACAD	O15069	NAC-alpha domain-containing protein 1	+	2,761779	1,16675
SRC	P12931	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	+	1,726472	0,5374959
CELF2	O95319	CUGBP Elav-like family member 2	+	2,166789	0,6625845
NCDN	Q9UBB6	Neurochondrin	+	1,911561	0,6318486
CETN2	P41208	Centrin-2	+	2,152847	0,6132555
ATP1B3	P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	+	1,777102	0,6047983
VPS29	Q9UBQ0	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	+	3,233849	0,5128481
ALCAM	Q13740	CD166 antigen	+	1,759972	0,7432902
IDH3A	P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	+	1,916723	0,7843289
NEDD4L	Q96PU5	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	+	3,33094	0,6818075
ATP1B1	P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	+	3,813812	1,006639
SESTD1	Q86VW0	SEC14 domain and spectrin repeat-containing protein 1	+	2,555323	0,652142
PALM	O75781	Paralemmin-1	+	1,991674	0,9923477
NDUFS3	O75489	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	+	1,788518	0,5515873
RAB8B	Q92930	Ras-related protein Rab-8B	+	1,41629	0,5279107
SEPT8	Q92599	Septin-8	+	1,440574	0,6601355
EPN1	Q9Y613	Epsin-1	+	2,184027	0,5026627
TPD52	P55327	Tumor protein D52	+	2,850063	1,205267
GLRX	P35754	Glutaredoxin-1	+	1,684907	0,5291553
KIF21B	O75037	Kinesin-like protein KIF21B	+	1,806079	0,6900263
NAPG	Q99747	Gamma-soluble NSF attachment protein	+	2,367996	0,5257015
CASTOR2	A6NHX0	Cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 2	+	2,779302	0,5560346
LAMP1	P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	+	1,69661	0,566467
SYNJ1	O43426	Synaptojanin-1	+	3,086584	0,8608968
PPP3CB	P16298	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform	+	1,743752	0,8973551
GMFB	P60983	Glia maturation factor beta	+	1,710579	0,7138913
RAB3C	Q96E17	Ras-related protein Rab-3C	+	4,569152	1,6095972
SNX30	Q5VWJ9	Sorting nexin-30	+	3,388787	1,1180742
SCAMP1	O15126	Secretory carrier-associated membrane protein 1	+	3,913562	0,8711188
NDUFS8	O00217	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	+	1,551968	0,5093565
EPB41L1	Q9H4G0	Band 4.1-like protein 1	+	3,792674	1,0512199
GBA	P04062	Lysosomal acid glucosylceramidase	+	1,999685	0,6911435
GRB2	P62993	Growth factor receptor-bound protein 2	+	1,618705	0,6436291
CDKN1B	P46527	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	+	2,070816	0,8212385
BRK1	Q8WUW1	Protein BRICK1	+	1,483243	0,7534676
HAGH	Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	+	1,875415	0,8537848
EPB41L3	Q9Y2J2	Band 4.1-like protein 3	+	2,277617	0,883523
PRUNE	Q86TP1	Exopolyphosphatase PRUNE1	+	2,535991	0,6829209
KIFAP3	Q92845	Kinesin-associated protein 3	+	2,280302	0,5773098
RAB3A	P20336	Ras-related protein Rab-3A	+	2,542981	1,3237326
CADM4	Q8NFZ8	Cell adhesion molecule 4	+	2,000087	0,9309525
SCARB2	Q14108	Lysosome membrane protein 2	+	1,77655	0,5281262
ATP6V0D1	P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	+	2,802038	0,7485282
CHTOP	Q9Y3Y2	Chromatin target of PRMT1 protein	+	1,832727	0,7287855
MAPRE3	Q9UPY8	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	+	1,948786	0,9281453

NDUFA2	O43678	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	+	1,546446	0,7304587
ARPC5L	Q9BPX5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	+	1,588813	0,581737
NUDT3	O95989	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	+	2,154794	0,6669364
NDRG4	Q9ULP0	Protein NDRG4	+	2,271212	0,8797998
SYNM	O15061	Synemin	+	1,630594	1,0080957
ACOT8	O14734	Acyl-coenzyme A thioesterase 8	+	1,758459	0,5252333
LAMTOR2	Q9Y2Q5	Ragulator complex protein LAMTOR2	+	1,410182	0,5393496
SORT1	Q99523	Sortilin	+	2,166384	0,5074987
ACYP1	P07311	Acylphosphatase-1	+	2,308656	0,5568929
NDRG2	Q9UN36	Protein NDRG2	+	2,049388	0,506278
UBE2V1	Q13404	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	+	1,805468	0,5974791
FYN	P06241	Tyrosine-protein kinase Fyn	+	2,011807	0,5792642
S100A11	P31949	Protein S100-A11	+	2,95025	0,8060987
NLGN4X	Q8NOW4	Neurologin-4, X-linked	+	2,83973	1,0746045
MANBA	O00462	Beta-mannosidase	+	1,747712	0,5161352
LGALS3BP	Q08380	Galectin-3-binding protein	+	2,703727	0,5196512
ATP5D	P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	+	2,929356	0,5205305
SFXN3	Q9BWM7	Sideroflexin-3	+	1,400876	0,5431324
WDR47	O94967	WD repeat-containing protein 47	+	2,129421	0,7967868
SYT1	P21579	Synaptotagmin-1	+	2,682649	0,8301795
ATP6V0A1	Q93050	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a1	+	1,752185	0,5144625
GPRIN1	Q7Z2K8	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	+	2,701943	1,058548
ATL1	Q8WXF7	Atlantin-1	+	2,371887	0,5129004
PRRT2	Q7Z6L0	Proline-rich transmembrane protein 2	+	2,361654	0,9506497
LRRC4B	Q9NT99	Leucine-rich repeat-containing protein 4B	+	1,717645	0,573957
BTBD17	A6NE02	BTB/POZ domain-containing protein 17	+	1,60963	0,6009483
GABARAP L2	P60520	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	+	1,708645	0,5873752
CADPS	Q9ULU8	Calcium-dependent secretion activator 1	+	2,221179	0,657083
THSD7A	Q9UPZ6	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A	+	1,631744	0,7321219
MFGE8	Q08431	Lactadherin	+	2,743015	0,7382247
LIN7A	O14910	Protein lin-7 homolog A	+	2,501478	1,3516046
PFDN4	Q9NQP4	Prefoldin subunit 4	+	1,922721	0,5842221
HEXB	P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	+	1,717545	0,509562
ESPN	B1AK53	Espin	+	1,78344	0,7219598
VTA1	Q9NP79	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	+	1,731469	0,7438419
CPE	P16870	Carboxypeptidase E	+	1,355967	0,7546017
CADM2	Q8N3J6	Cell adhesion molecule 2	+	2,608605	1,6464427
KIDINS220	Q9ULH0	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	+	1,903863	0,8335011
SLC4A8	Q2YOW8	Electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1	+	1,503909	0,9811375
MAB21L2	Q9Y586	Protein mab-21-like 2	+	2,122308	0,8942697
SCG3	Q8WXD2	Secretogranin-3	+	2,800121	1,2559083
SEMA4C	Q9C0C4	Semaphorin-4C	+	1,457814	0,5082059
TSC22D1	Q15714	TSC22 domain family protein 1	+	3,258502	0,5525537
UCHL3	P15374	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	+	1,619133	0,5546944
IGSF3	O75054	Immunoglobulin superfamily member 3	+	2,874793	0,7334824
ROBO2	Q9HCK4	Roundabout homolog 2	+	2,199406	0,559617
ACC	P43146	Netrin receptor ACC	+	4,754863	0,5630587
PDE4DIP	Q5VU43	Myomegalin	+	2,861696	0,552
RAB6C	Q9H0N0	Ras-related protein Rab-6C	+	2,289349	0,6859958
SMAP2	Q8WU79	Stromal membrane-associated protein 2	+	1,343853	0,6712229
CBARP	Q8N350	Voltage-dependent calcium channel beta subunit-associated regulatory protein	+	1,526579	0,7466083
SH3GL2	Q99962	Endophilin-A1	+	1,960913	0,7742243
ERLEC1	Q96DZ1	Endoplasmic reticulum lectin 1	+	2,222194	0,5069933
FAM169A	Q9Y6X4	Soluble lamin-associated protein of 75 kDa	+	1,537423	0,8734436
CCDC91	Q7Z6B0	Coiled-coil domain-containing protein 91	+	3,60444	0,5178895
BORCS5	Q969J3	BLOC-1-related complex subunit 5	+	2,321286	0,5302005
EVL	Q9UI08	Ena/VASP-like protein	+	1,378851	0,6856117
NCAM2	O15394	Neural cell adhesion molecule 2	+	2,031106	1,076674
PRMT2	P55345	Protein arginine N-methyltransferase 2	+	2,801708	0,5610774
GDAP1L1	Q96MZ0	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	+	2,320048	0,8711376
ABLIM1	O14639	Actin-binding LIM protein 1	+	2,053551	0,7762446
CLPP	Q16740	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	+	2,179648	0,7578719
PPP3R1	P63098	Calcineurin subunit B type 1	+	1,301326	0,8682468

CLTB	P09497	Clathrin light chain B	+	4,073192	1,3013813
VPS37C	A5D8V6	Vacuolar protein sorting-associated protein 37C	+	1,86136	0,5519273
SYNE1	Q8NF91	Nesprin-1	+	2,16791	0,5229135
EDIL3	O43854	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	+	1,96815	0,963985
PTPRD	P23468	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	+	1,422623	0,5386311
P4HTM	Q9NXG6	Transmembrane prolyl 4-hydroxylase	+	2,6617	0,6198559
KRT15	P19012	Keratin, type I cytoskeletal 15	+	1,649106	2,1089892
CELF3	Q5SZQ8	CUGBP Elav-like family member 3	+	2,087984	0,5615087
	Q96B45	BLOC-1-related complex subunit 7	+	2,060847	0,6120412
PDP1	Q9P0J1	[Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 1, mitochondrial	+	1,858359	0,6017511
NDUFA3	O95167	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	+	1,449743	0,5444856
SH3GLB2	Q9NR46	Endophilin-B2	+	2,248245	0,5228989
NTM	Q9P121	Neurotrimin	+	3,093098	1,0120676
REM2	Q8IYK8	GTP-binding protein REM 2	+	2,890151	0,9468038
TRIM36	Q9NQ86	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM36	+	3,727853	0,6136134
RRAGC	Q9HB90	Ras-related GTP-binding protein C	+	2,054094	0,5529873
SLC1A4	P43007	Neutral amino acid transporter A	+	1,3122	0,7810202
CADM3	Q8N126	Cell adhesion molecule 3	+	1,874489	0,7954668
EDEM3	Q9BZQ6	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 3	+	1,770398	0,572823
PVALEF	A0A1B0G WK0	Parvalbumin-like EF-hand-containing protein	+	3,165926	0,945573
SYN1	P17600	Synapsin-1	+	1,420682	1,3043683
VPS33B	Q9H267	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B	+	1,447002	0,7307076
RUFY2	Q8WXA3	RUN and FYVE domain-containing protein 2	+	2,161668	0,6747026
OPTN	Q96CV9	Optineurin	+	1,77864	0,8729217
SULT2B1	O00204	Sulfotransferase 2B1	+	2,272685	1,2197695
WASHC3	Q9Y3C0	WASH complex subunit 3	+	3,028831	0,7075639
ANKIB1	Q9P2G1	Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1	+	3,142093	0,8191085
SIRT2	Q8IXJ6	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	+	1,613761	0,6131207
MEX3C	Q5U5Q3	RNA-binding E3 ubiquitin-protein ligase MEX3C	+	1,59949	0,5706778
TTYH3	Q9C0H2	Protein tweety homolog 3	+	2,414927	1,0775793
FAM114A1	Q8IWE2	Protein NOXP20	+	1,851812	0,5096532
MBD1	Q9UIS9	Methyl-CpG-binding domain protein 1	+	1,720785	0,7649603
LAMP5	Q9UJQ1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 5	+	2,643019	1,273793
GATD1	Q8NB37	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 1	+	1,774146	0,5464702
PAM	P19021	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	+	1,848393	0,5477383
GPM6B	Q13491	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	+	2,416039	0,5063696
SHROOM2	Q13796	Protein Shroom2	+	1,848908	0,58881
CALB1	P05937	Calbindin	+	1,4851	0,7619531
PCSK1N	Q9UHG2	ProSAAS	+	2,684512	1,671351
PRKCB	P05771	Protein kinase C beta type	+	2,135124	0,5595412
NCAN	O14594	Neurocan core protein	+	2,251628	0,6202624
CACNA2D2	Q9NY47	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2	+	1,675392	1,0346398
PURA	Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha	+	3,653487	0,5059341
PDLIM3	Q53GG5	PDZ and LIM domain protein 3	+	1,49154	0,6317546
RAC3	P60763	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	+	1,889035	0,5110191
PPP1R9A	Q9ULJ8	Neurabin-1	+	1,329309	0,7726574
STX1B	P61266	Syntaxin-1B	+	2,3009	1,5719726
RPS6KA2	Q15349	Ribosomal protein S6 kinase alpha-2	+	2,04309	0,8350682
PODXL2	Q9NZ53	Podocalyxin-like protein 2	+	3,230601	0,764185
KCTD21	Q4G0X4	BTB/POZ domain-containing protein KCTD21	+	1,455479	0,7871566
LAMA2	P24043	Laminin subunit alpha-2	+	2,836464	0,5772512
IFIT3	O14879	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	+	2,39038	0,6239798
ZNF512	Q96ME7	Zinc finger protein 512	+	2,208882	0,5272355
GM2A	P17900	Ganglioside GM2 activator	+	1,579184	0,5606508
SH3RF1	Q7Z6J0	E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1	+	2,501071	0,5987689
MYT1	Q01538	Myelin transcription factor 1	+	2,857899	0,8296075
LY6H	O94772	Lymphocyte antigen 6H	+	3,297965	0,979533
MAN2B2	Q9Y2E5	Epididymis-specific alpha-mannosidase	+	1,57097	0,9262519
PDE1B	Q01064	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	+	1,439166	0,8548704
MAP7D2	Q96T17	MAP7 domain-containing protein 2	+	1,617283	1,0822084
GNAZ	P19086	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	+	2,55875	0,953145

CHGB	P05060	Secretogranin-1	+	2,601411	1,1870944
MBLAC2	Q68D91	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	+	3,745596	0,5282301
APOC3	P02656	Apolipoprotein C-III	+	1,375415	0,7178329
LAMP2	P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	+	2,463175	0,5908167
SEZ6L2	Q6UXD5	Seizure 6-like protein 2	+	1,922871	0,9582036
CD59	P13987	CD59 glycoprotein	+	1,374646	0,513171
DYNC2H1	Q8NCM8	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	+	1,920989	0,8093243
MPP2	Q14168	MAGUK p55 subfamily member 2	+	1,547143	0,7083886
C16orf45	Q96MC5	bMERB domain-containing protein 1	+	1,720735	0,7345185
PAK7;PAK5	Q9P286	Serine/threonine-protein kinase PAK 5	+	3,023386	1,514217
SMPD3	Q9NY59	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	+	3,435826	0,9810435
	Q8N2Q7	Neuroigin-1	+	2,322074	0,6335263
KIAA0513	O60268	Uncharacterized protein KIAA0513	+	1,895384	0,7849836
LBH	Q53QV2	Protein LBH	+	2,774287	1,0809554
CSPG5	O95196	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	+	2,001071	0,6266901
DNAJC5	Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5	+	1,686774	0,6065689
COPS9	Q8WXC6	COP9 signalosome complex subunit 9	+	1,449243	0,5665195
CLTA	P09496	Clathrin light chain A	+	1,974373	0,945055
SS18L1	O75177	Calcium-responsive transactivator	+	1,658153	0,8696423
TPPP	O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	+	2,696773	1,0153723
HINT3	Q9NQE9	Histidine triad nucleotide-binding protein 3	+	2,156311	0,570727
PIK3R3	Q92569	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	+	1,951964	0,7538933
CTIF	O43310	CBP80/20-dependent translation initiation factor	+	1,781339	0,779325
FAM171A2	A8MVW0	Protein FAM171A2	+	1,938888	0,6582332
PPP2R5B	Q15173	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit beta isoform	+	1,912145	0,5801303
EPN2	O95208	Epsin-2	+	1,725888	0,586359
DENND1A	Q8TEH3	DENN domain-containing protein 1A	+	1,455013	0,5954505
POLR2M	Q6EEV4	DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A, isoforms 4/5	+	1,738266	0,6924326
RAB39B	Q96DA2	Ras-related protein Rab-39B	+	1,477421	0,5376983
ATRN	O75882	Attractin	+	1,681399	0,5342536
SLC8A1	P32418	Sodium/calcium exchanger 1	+	1,617291	0,9532176
SKAP1	Q86WV1	Src kinase-associated phosphoprotein 1	+	2,759316	0,7070965
HECW1	Q76N89	E3 ubiquitin-protein ligase HECW1	+	2,356595	1,0999732
PRKCZ	Q05513	Protein kinase C zeta type	+	2,311777	0,7697537
AVL9	Q8NBF6	Late secretory pathway protein AVL9 homolog	+	1,715572	0,635093
MAP1LC3A	Q9H492	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	+	1,682779	0,5106758
KRT76	Q01546	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	+	1,740921	0,7167253
CASKIN1	Q8WXD9	Caskin-1	+	2,608134	0,561944
CHGA	P10645	Chromogranin-A	+	1,905518	1,5059116
XKR7	Q5GH72	XK-related protein 7	+	1,787126	0,6789284
PPFIA2	O75334	Liprin-alpha-2	+	1,575344	0,6779869
SST	P61278	Somatostatin	+	1,973573	1,0187504
CELSR3	Q9NYQ7	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	+	2,70919	0,5624739
REEP1	Q9H902	Receptor expression-enhancing protein 1	+	1,448498	0,6729212
KLHL25	Q9H0H3	Kelch-like protein 25	+	1,883252	1,0158335
ITFG1	Q8TB96	T-cell immunomodulatory protein	+	1,604938	0,8284962
PCDH7	O60245	Protocadherin-7	+	1,960623	1,1632414
TSC22D3	Q99576	TSC22 domain family protein 3	+	3,825833	0,5532187
PPFIA3	O75145	Liprin-alpha-3	+	2,568557	0,5588959
CCHCR1	Q8TD31	Coiled-coil alpha-helical rod protein 1	+	2,038597	1,3171759
TOM1L2	Q6ZVM7	TOM1-like protein 2	+	1,910372	0,534662
DMD	P11532	Dystrophin	+	1,675409	0,527647
SORBS1	Q9BX66	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	+	2,679553	0,6752769
SH3PXD2A	Q5TCZ1	SH3 and PX domain-containing protein 2A	+	1,689754	0,5594319
GFAP	P14136	Glial fibrillary acidic protein	+	2,242351	0,9644822
GUK1	Q16774	Guanylate kinase	+	1,377636	0,64039
S100A10	P60903	Protein S100-A10	+	1,510614	0,5555565
SLC1A2	P43004	Excitatory amino acid transporter 2	+	2,633957	1,7582229
COL26A1	Q96A83	Collagen alpha-1(XVI) chain	+	1,382438	0,5390005
ASTE1	Q2TB18	Protein asteroid homolog 1	+	1,802402	0,6351135
PCNT	O95613	Pericentrin	+	1,326725	0,5315167
SCAI	Q8N9R8	Protein SCAI	+	2,159716	0,6492152
PLXNA4	Q9HCM2	Plexin-A4	+	2,341609	1,6868783
PSEN1	P49768	Presenilin-1	+	1,946591	1,0784569
IL6R	P08887	Interleukin-6 receptor subunit alpha	+	2,463377	0,7751203
FSIP1	Q8NA03	Fibrous sheath-interacting protein 1	+	2,07183	1,4978338

GRID1	Q9ULK0	Glutamate receptor ionotropic, delta-1	+	1,590253	0,64249
SPTY2D1	Q68D10	Protein SPT2 homolog	+	1,847152	0,7934613
TANC2	Q9HCD6	Protein TANC2	+	2,352859	1,1284996
FAM89B	Q8N5H3	Leucine repeat adapter protein 25	+	1,61939	1,1068228
NRXN1	P58400	Neurexin-1-beta	+	1,739846	0,6395103
NPAS3	Q8IXF0	Neuronal PAS domain-containing protein 3	+	1,631731	0,6220541
ONECUT3	O60422	One cut domain family member 3	+	1,94552	0,6962566
ETFDH	Q16134	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	+	3,089068	0,688002
SERPINI1	Q99574	Neuroserpin	+	2,790437	1,4748389
C1orf122	Q6ZSJ8	Uncharacterized protein C1orf122	+	1,539353	0,7322608
EN1	Q05925	Homeobox protein engrailed-1	+	1,373117	0,5809543
ATCAY	Q86WG3	Caytaxin	+	1,840659	0,5119679
CDH13	P55290	Cadherin-13	+	3,305655	1,3500482
ABCC10	Q5T3U5	Multidrug resistance-associated protein 7	+	2,841081	0,5830617
CCDC184	Q52MB2	Coiled-coil domain-containing protein 184	+	2,788702	0,9063259
NAP1L5	Q96NT1	Nucleosome assembly protein 1-like 5	+	1,448556	0,7659484
C6orf203	Q9P0P8	Mitochondrial transcription rescue factor 1	+	1,478394	0,5425334
BPGM	P07738	Bisphosphoglycerate mutase	+	1,699796	0,6061585
DEPDC1	Q5TB30	DEP domain-containing protein 1A	+	2,054696	2,2798193
TMEM63B	Q5T3F8	CSC1-like protein 2	+	1,439595	0,5781122
SNRK	Q9NRH2	SNF-related serine/threonine-protein kinase	+	2,020019	0,5712564
LYSMD1	Q96S90	LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 1	+	1,725695	0,5393077
GNG3	P63215	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O)	+	1,406149	0,5836895
AMIGO1	Q86WK6	Amphoterin-induced protein 1	+	2,249788	0,6847935
PLEKHG2	Q9H7P9	Pleckstrin homology domain-containing family G member 2	+	2,143527	0,7629194
PTPRJ	Q12913	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	+	2,249013	0,7092463
PTPRE	P23469	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon	+	1,491497	0,6075325
ABCC9	O60706	ATP-binding cassette sub-family C member 9	+	2,283201	1,3595732
LMBRD1	Q9NUN5	Lysosomal cobalamin transport escort protein LMBD1	+	2,323552	0,7628987
LRRTM2	O43300	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2	+	1,64054	0,6188518
FBLL1	A6NHQ2	rRNA/tRNA 2'-phosphoguanidyltransferase	+	1,992617	0,9079072
PAG1	Q9NWQ8	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1	+	1,631931	0,9172034
CD200	P41217	CD200	+	1,964726	1,3299346
BSN	Q9UPA5	Protein bassoon	+	2,187926	1,8714125
RGMB	Q6NW40	RGM domain family member B	+	1,400682	0,6202564
MARCO	Q9UEW3	Macrophage receptor MARC	+	1,384689	1,0218127
RYBP	Q8N488	RING1 and YY1-binding protein	+	1,722128	1,448631
DDX58	Q95786	Antiviral innate immune response receptor RIG-I	+	2,311651	1,0235934
ZCCHC14	Q8WYQ9	Zinc finger CCHC domain-containing protein 14	+	1,550086	1,430068
PITPNM2	Q9BZ72	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2	+	2,316843	1,229748
GATM	P50440	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	+	1,882083	0,6454825
NUMBL	Q9Y6R0	Numb-like protein	+	1,697475	0,5680578
TDRD15	B5MCY1	Tudor domain-containing protein 15	+	1,399806	0,5727358
VIPR2	P41587	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 2	+	2,851378	1,2040954
GIF	P27352	Cobalamin binding intrinsic factor	+	1,450552	1,2782564
LMTK3	Q96Q04	Serine/threonine-protein kinase LMTK3	+	2,161769	0,9023719
WNT5A	P41221	Protein Wnt-5a	+	1,386925	0,8262396
STX1A	Q16623	Syntaxin-1A	+	2,948578	1,7967696
KIAA1549	Q9HCM3	UPF0606 protein KIAA1549	+	3,380108	0,8068607
SRSF8	Q9BRL6	Serine/arginine-rich splicing factor 8	+	3,098209	0,6988673
RIMBP2	O15034	RIMS-binding protein 2	+	1,834144	0,5258214
ARHGEF17	Q96PE2	Rho guanine nucleotide exchange factor 17	+	1,807385	0,6916125
DOCK3	Q8IZD9	Dedicator of cytokinesis protein 3	+	2,148708	0,8047497
NPDC1	Q9NQX5	Neural proliferation differentiation and control protein 1	+	2,848816	1,1125603
CNNM2	Q9H8M5	Metal transporter CNNM2	+	1,422523	0,6634994
SULT4A1	Q9BR01	Sulfotransferase 4A1	+	2,070986	1,5331144
GPM6A	P51674	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	+	1,77206	0,941879
KCND1	Q9NSA2	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 1	+	2,008616	0,5862567
RUNDC3A	Q59EK9	RUN domain-containing protein 3A	+	2,126821	1,1332338
LRRC4	Q9HBW1	Leucine-rich repeat-containing protein 4	+	2,055476	0,7380917
TMEM181	Q9P2C4	Transmembrane protein 181	+	2,347877	1,3780439

C1QTNF4	Q9BXJ3	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 4	+	1,493592	0,8475358
RTN1	Q16799	Reticulon-1	+	1,850134	1,3891311
PCDH10	Q9P2E7	Protocadherin-10	+	2,030268	0,6464872
PKD1	Q15118	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial	+	1,666212	0,5938854
SLC24A1	O60721	Sodium/potassium/calcium exchanger 1	+	2,290761	0,5399635
DNAJC6	O75061	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	+	2,326046	0,62549
MARS2	Q96GW9	Methionine--tRNA ligase, mitochondrial	+	1,499488	0,5493495
SLITRK1	Q96PX8	SLIT and NTRK-like protein 1	+	2,047706	1,1417367
FMO4	P31512	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 4	+	1,992231	0,5836291
SLC25A46	Q96AG3	Solute carrier family 25 member 46	+	1,59208	0,5072117
PLCB1	Q9NQ66	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	+	1,451921	0,5658681
NICN1	Q9BSH3	Nicolin-1	+	1,857277	0,5736203
PSG4	Q00888	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 4	+	1,968543	0,5069497
SPX	Q9BT56	Spexin	+	1,451031	0,5160434
ERVK-8	P63133	Endogenous retrovirus group K member 8 Pol protein	+	1,607178	0,7114794
CPQ	Q9Y646	Carboxypeptidase Q	+	1,801738	0,5645399
NOL4L	Q96MY1	Nucleolar protein 4-like	+	2,791421	0,6925361
CASD1	Q96PB1	N-acetylneuraminate 9-O-acetyltransferase	+	1,419983	0,8585861
FOSB	P53539	Protein fosB	+	1,3406	0,6024451
Q8NAA6	Q8NAA6	Putative uncharacterized protein encoded by LINC02694	+	1,310206	0,761379
PCDH1	Q08174	Protocadherin-1	+	2,062321	0,7043459
MYO1E	Q12965	Unconventional myosin-Ie	+	1,745449	0,6584163
LRR1	Q9BTT6	Leucine-rich repeat-containing protein 1	+	1,367872	0,6633506
MYO7B	Q6PIF6	Unconventional myosin-VIIb	+	1,697332	0,7099526
SERPINB9	P50453	Serpin B9	+	1,921265	0,9726698
TTC7A	Q9ULT0	Tetratricopeptide repeat protein 7A	+	2,313197	0,9678326
MICALCL	Q6ZW33	MICAL C-terminal-like protein	+	4,053639	0,5018041
IRF4	Q15306	Interferon regulatory factor 4	+	3,090816	0,5235448
AXDND1	Q5T1B0	Axonemal dynein light chain domain-containing protein 1	+	1,547438	0,758621
RHPN2P1	A8MT19	Putative raphilin-2-like protein RHPN2P1	+	1,492493	0,9189148
TTLL8	A6PVC2	Protein monoglycylase TTLL8	+	3,20655	0,7544792
DNAH5	Q8TE73	Dynein heavy chain 5, axonemal	+	2,897619	0,6198893
ISCU	Q9H1K1	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial	+	1,950033	0,7236104
SCAPER	Q9BY12	S phase cyclin A-associated protein in the endoplasmic reticulum	+	2,276276	1,0875597
ZSCAN29	Q8IWI8	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 29	+	2,231052	0,8591919
SNAPC5	O75971	snRNA-activating protein complex subunit 5	+	1,559588	0,6105156
CGNL1	Q0VF96	Cingulin-like protein 1	+	1,77791	1,1905916
GABRA2	P47869	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2	+	1,642676	0,7836077
ADCY8	P40145	Adenylate cyclase type 8	+	2,760859	0,8521688
UNC5A	Q6ZN44	Netrin receptor UNC5A	+	2,215827	1,3968678
KCTD4	Q8WVF5	BTB/POZ domain-containing protein KCTD4	+	1,400118	0,9146469
CLSTN1	O94985	Calsyntenin-1	+	1,83818	0,5561719
BHMT2	Q9H2M3	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2	+	2,193197	0,7489841
FHAD1	B1AJZ9	Forkhead-associated domain-containing protein 1	+	2,537525	0,7948976
FBXL19	Q6PCT2	F-box/LRR-repeat protein 19	+	1,605166	0,5640514
COL6A6	A6NMZ7	Collagen alpha-6(VI) chain	+	1,48434	0,6764898
EEF1A1	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	-	2,003934	-0,5568018
FLNA	P21333	Filamin-A	-	2,053987	-0,6116984
FASN	P49327	Fatty acid synthase	-	2,349194	-0,5097919
PRKDC	P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	-	2,275978	-0,7806599
SNRNP200	O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	-	2,087103	-0,6534986
XRCC6	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	-	1,795931	-0,6347442
PARP1	P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	-	2,02145	-0,7508302
CHD4	Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	-	2,331454	-0,5355337
PTBP1	P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	-	2,479583	-0,7524722
RCC2	Q9P258	Protein RCC2	-	2,378002	-0,6341655
SF3B1	O75533	Splicing factor 3B subunit 1	-	2,309438	-0,6962848
CTNNA1	P35221	Catenin alpha-1	-	2,903045	-0,5546372
HNRNPR	O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	-	1,722067	-0,671803

MCM2	P49736	DNA replication licensing factor MCM2	-	2,832482	-0,6215622
TMPO	P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	-	2,313443	-0,5253813
SYNCRIP	O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	-	2,101231	-0,6400754
TOP2B	Q02880	DNA topoisomerase 2-beta	-	2,35987	-0,6308167
SSB	P05455	Lupus La protein	-	1,799627	-0,6708651
IGF2BP1	Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	-	2,55808	-0,6494339
MCM6	Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	-	2,534494	-0,6834857
MCM4	P33991	DNA replication licensing factor MCM4	-	2,736324	-0,6594777
IGF2BP3	O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	-	1,668311	-0,5333738
EIF3A	Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	-	2,881364	-0,5296929
RPS2	P15880	40S ribosomal protein S2	-	2,179659	-0,7308631
SMARCA5	O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	-	1,876478	-0,6818128
MCM7	P33993	DNA replication licensing factor MCM7	-	2,806263	-0,6876132
SMC1A	Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	-	3,700022	-0,6716955
KPNA2	P52292	Importin subunit alpha-1	-	2,986609	-0,5387311
MCM3	P25205	DNA replication licensing factor MCM3	-	2,45569	-0,9460735
MCM5	P33992	DNA replication licensing factor MCM5	-	2,782354	-1,0156405
SMARCA4	P51532	Transcription activator BRG1	-	2,581266	-0,7744277
DDX3X	O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	-	1,664605	-0,9875484
PPP2R1B	P30154	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	-	1,878283	-0,5555902
NOP58	Q9Y2X3	Nucleolar protein 58	-	2,114755	-0,8377762
PSIP1	O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein	-	2,134531	-0,5977054
TOP2A	P11388	DNA topoisomerase 2-alpha	-	2,314859	-0,9710402
EIF2S3	P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	-	1,985717	-0,6092587
ABCF1	Q8NE71	ATP-binding cassette sub-family F member 1	-	3,839139	-0,7842379
ADSL	P30566	Adenylosuccinate lyase	-	1,361967	-0,6195261
MSH6	P52701	DNA mismatch repair protein Msh6	-	1,844809	-0,7647588
HDLBP	Q00341	Vigilin	-	2,156671	-0,5075169
PDS5B	Q9NTI5	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	-	2,838477	-0,5150681
KIAA0368	Q5VYK3	Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	-	2,766088	-0,5872147
RPS3	P23396	40S ribosomal protein S3	-	1,864913	-0,6934893
ZNF638	Q14966	Zinc finger protein 638	-	1,906223	-0,5304148
PDS5A	Q29RF7	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	-	2,586631	-0,5741961
TOP1	P11387	DNA topoisomerase 1	-	2,065783	-0,8236444
NUP205	Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205	-	2,245345	-0,6409335
ZFR	Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein	-	2,299332	-0,5938394
DEK	P35659	Protein DEK	-	2,184926	-0,8340936
SART3	Q15020	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	-	2,252484	-0,5762794
PRPF6	O94906	Pre-mRNA-processing factor 6	-	2,592385	-0,5660031
RCC1	P18754	Regulator of chromosome condensation	-	2,314956	-0,5338428
EIF5	P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5	-	1,403231	-0,5991149
NOP56	O00567	Nucleolar protein 56	-	2,717273	-0,6312072
EIF3D	O15371	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	-	2,848423	-0,9128439
PSAP	P07602	Prosaposin	-	1,506108	-0,7986887
RPL7A	P62424	60S ribosomal protein L7a	-	2,080823	-0,5215621
ESYT1	Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	-	3,619411	-0,6274035
ABCE1	P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	-	2,360003	-0,6777961
DRG1	Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	-	2,713966	-1,1371274
HMGB2	P26583	High mobility group protein B2	-	1,683835	-1,0335379
RPL10A	P62906	60S ribosomal protein L10a	-	1,662097	-0,9113383
STRBP	Q96SI9	Spermatid perinuclear RNA-binding protein	-	1,363699	-0,6382089
THOC2	Q8NI27	THO complex subunit 2	-	3,088316	-0,6748157
CHD7	Q9P2D1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	-	2,314235	-0,5133703
RPS10	P46783	40S ribosomal protein S10	-	1,869823	-0,5591061
CORO1C	Q9ULV4	Coronin-1C	-	2,845081	-0,5510612
ALYREF	Q86V81	THO complex subunit 4	-	1,955445	-0,7283769
SKIV2L2	P42285	Exosome RNA helicase MTR4	-	2,08868	-0,6101229
FDFT1	P37268	Squalene synthase	-	3,588223	-0,7644136
RPS14	P62263	40S ribosomal protein S14	-	1,776497	-0,5531681
DIAPH1	O60610	Protein diaphanous homolog 1	-	2,652242	-0,5960245
PBRM1	Q86U86	Protein polybromo-1	-	2,867897	-1,0931177
RPS15A	P62244	40S ribosomal protein S15a	-	1,832595	-1,1048825
SMC4	Q9NTJ3	Structural maintenance of chromosomes protein 4	-	2,698044	-0,7585659

ANP32B	Q92688	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	-	1,859615	-0,6347315
U2SURP	O15042	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	-	2,77568	-0,6928473
RPL30	P62888	60S ribosomal protein L30	-	2,01379	-0,7800081
FEN1	P39748	Flap endonuclease 1	-	2,270595	-1,0155063
HEATR1	Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1	-	2,259503	-0,6129911
SMARCD1	Q96GM5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1	-	2,104469	-0,5180402
PYGL	P06737	Glycogen phosphorylase, liver form	-	2,225533	-0,5825279
LRRC59	Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	-	1,804165	-0,5291598
NAA15	Q9BXJ9	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	-	1,960463	-0,6386614
USP39	Q53GS9	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	-	2,900445	-0,7469108
NAMPT	P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	-	1,886768	-0,5453501
SNRPD1	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	-	1,611005	-0,5644512
EXOSC10	Q01780	Exosome component 10	-	3,410548	-0,6933258
NCAPD2	Q15021	Condensin complex subunit 1	-	2,245099	-0,6812117
HAT1	O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	-	2,136866	-0,8896177
SERBP1	Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	-	1,433279	-0,612097
RPRD1A	Q96P16	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A	-	1,760395	-0,6492157
LIG3	P49916	DNA ligase 3	-	1,827318	-0,6679738
RPS19	P39019	40S ribosomal protein S19	-	1,792593	-0,6565156
STAT1	P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	-	2,312616	-0,6279225
NCAPG	Q9BPX3	Condensin complex subunit 3	-	3,499921	-0,6613741
RPS17	P08708	40S ribosomal protein S17	-	2,161958	-0,5731487
SNRNP70	P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	-	1,483807	-0,6757002
FHL1	Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	-	1,840859	-0,8798661
POU3F2	P20265	POU domain, class 3, transcription factor 2	-	2,580182	-0,9261847
RPL23	P62829	60S ribosomal protein L23	-	1,662163	-0,6862659
TRIP12	Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	-	3,134126	-0,6226342
CARS	P49589	Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	-	1,703591	-0,6914034
NUP210	Q8TEM1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	-	1,725628	-0,5656979
YBX3	P16989	Y-box-binding protein 3	-	2,075895	-0,6909797
THOP1	P52888	Thimet oligopeptidase	-	2,484242	-0,5889139
CSTF3	Q12996	Cleavage stimulation factor subunit 3	-	2,425944	-0,7984245
ZMYM2	Q9UBW7	Zinc finger MYM-type protein 2	-	2,626364	-0,5153909
RPL12	P30050	60S ribosomal protein L12	-	2,054668	-0,7552752
DDX23	Q9BUQ8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	-	1,523835	-0,5718088
VRK1	Q99986	Serine/threonine-protein kinase VRK1	-	2,476655	-0,7558475
CUL4A	Q13619	Cullin-4A	-	1,902261	-0,7118011
DNMT1	P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	-	2,3511	-0,7034743
TTC37	Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	-	3,606751	-0,55264
LIN28A	Q9H9Z2	Protein lin-28 homolog A	-	1,87878	-0,8139129
RPL7	P18124	60S ribosomal protein L7	-	1,451531	-0,5980992
POLD1	P28340	DNA polymerase delta catalytic subunit	-	2,810156	-0,8956172
DHX36	Q9H2U1	ATP-dependent DNA/RNA helicase DHX36	-	2,320132	-0,5249171
RPS5	P46782	40S ribosomal protein S5	-	1,442871	-0,6541505
RFC3	P40938	Replication factor C subunit 3	-	1,955204	-1,0059605
RPS11	P62280	40S ribosomal protein S11	-	1,586376	-0,6729889
RPL17	P18621	60S ribosomal protein L17	-	1,301591	-0,5705035
NIPBL	Q6KC79	Nipped-B-like protein	-	1,797614	-0,6373479
ZC3H11A	O75152	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	-	3,464484	-0,6789682
RPL22	P35268	60S ribosomal protein L22	-	2,780321	-0,8176799
ECI2	O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2	-	2,300284	-0,6833816
DDX50	Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50	-	2,04189	-0,7148249
RPL24	P83731	60S ribosomal protein L24	-	4,041051	-0,7589502
RPL18	Q07020	60S ribosomal protein L18	-	2,888053	-0,5752897
SHMT1	P34896	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	-	1,618406	-0,7527828
SLC25A5	P05141	ADP/ATP translocase 2	-	2,556612	-0,5774124
CDK2	P24941	Cyclin-dependent kinase 2	-	3,240668	-0,5174832
NLRP2	Q9NX02	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 2	-	2,126186	-0,6423106
EIF2AK2	P19525	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	-	1,652056	-0,6317682
PYM1	Q9BRP8	Partner of Y14 and mago	-	1,987885	-0,6021037
CNBP	P62633	Cellular nucleic acid-binding protein	-	2,228904	-1,1195641
PHF6	Q8IWS0	PHD finger protein 6	-	2,160229	-1,01564

CHD1	O14646	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	-	1,767187	-0,5568273
KIF15	Q9NS87	Kinesin-like protein KIF15	-	1,839296	-0,506824
DHX16	O60231	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16	-	2,665229	-0,5727913
CENPV	Q7Z7K6	Centromere protein V	-	3,316665	-1,003315
SNW1	Q13573	SNW domain-containing protein 1	-	3,464061	-0,6264663
SALL4	Q9UJQ4	Sal-like protein 4	-	1,838393	-0,5261111
SNRPD3	P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	-	2,863882	-0,8477345
LBR	Q14739	Delta(14)-sterol reductase LBR	-	1,826652	-0,5706749
GSTM1	P09488	Glutathione S-transferase Mu 1	-	1,589455	-0,6971254
MYBBP1A	Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	-	1,436358	-0,5836594
PIN4	Q9Y237	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	-	3,898771	-0,6992674
RPL38	P63173	60S ribosomal protein L38	-	1,826024	-0,6211357
RPL18A	Q02543	60S ribosomal protein L18a	-	1,949171	-0,8298721
SLK	Q9H2G2	STE20-like serine/threonine-protein kinase	-	2,498827	-0,5090456
TFAM	Q00059	Transcription factor A, mitochondrial	-	2,141473	-0,6454158
WDFY1	Q8IWB7	WD repeat and FYVE domain-containing protein 1	-	1,492227	-0,7123299
EIF1AX	P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	-	1,334653	-0,8204741
MRPS31	Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial	-	2,163359	-0,5759604
CEBPZ	Q03701	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	-	1,973122	-0,7442675
PTRH2	Q9Y3E5	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	-	1,398473	-0,5208249
UHRF1	Q96T88	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	-	2,530944	-0,8749728
PDCD4	Q53EL6	Programmed cell death protein 4	-	1,686242	-0,8011122
NOP9	Q86U38	Nucleolar protein 9	-	2,492285	-0,6570044
TAGLN	Q01995	Transgelin	-	1,594367	-0,6854389
NBAS	A2RRP1	Neuroblastoma-amplified sequence	-	2,326757	-0,6875029
TBC1D15	Q8TC07	TBC1 domain family member 15	-	1,525114	-0,5262904
RPS16	P62249	40S ribosomal protein S16	-	2,229278	-1,1389725
SPTLC1	O15269	Serine palmitoyltransferase 1	-	1,654392	-0,5590072
MRPS7	Q9Y2R9	28S ribosomal protein S7, mitochondrial	-	2,632903	-0,7095435
STT3A	P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	-	1,700656	-0,6423733
NELFB	Q8WX92	Negative elongation factor B	-	1,861223	-0,6767168
EIF2AK4	Q9P2K8	eIF-2-alpha kinase GCN2	-	1,812284	-0,8597317
NAT10	Q9H0A0	RNA cytidine acetyltransferase	-	2,139593	-0,6948793
LPCAT1	Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	-	2,696239	-0,6128526
UBE2E1	P51965	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1	-	2,56548	-0,5597823
CRNKL1	Q9BZJ0	Crooked neck-like protein 1	-	2,968388	-0,5945926
CSRP1	P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	-	1,540536	-0,5287049
PRPF38B	Q5VTL8	Pre-mRNA-splicing factor 38B	-	1,868258	-0,6335416
PUS7	Q96P20	Pseudouridylate synthase 7 homolog	-	1,334291	-0,509975
NEMF	O60524	Nuclear export mediator factor NEMF	-	2,444645	-0,6407876
DDX47	Q9H0S4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	-	1,940001	-0,7878654
CASP6	P55212	Caspase-6	-	2,916593	-0,6694663
RPL11	P62913	60S ribosomal protein L11	-	3,311008	-0,5388508
PHF5A	Q7RTV0	PHD finger-like domain-containing protein 5A	-	2,224672	-1,0760686
CSNK2A2	P19784	Casein kinase II subunit alpha'	-	2,481444	-0,5790634
DMAP1	Q9NPF5	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	-	3,954137	-0,7838657
ORC3	Q9UBD5	Origin recognition complex subunit 3	-	1,776334	-0,6050107
DHX38	Q92620	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	-	2,060689	-0,7564721
METTL16	Q86W50	RNA N6-adenosine-methyltransferase METTL16	-	1,52699	-0,5617146
MRPS9	P82933	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	-	1,906167	-0,6755598
EXOSC3	Q9NQ75	Exosome complex component RRP40	-	1,559882	-0,9963415
PAXBP1	Q9Y5B6	PAX3- and PAX7-binding protein 1	-	1,827757	-0,5335727
TOMM34	Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34O	-	1,926242	-0,5775981
DNAAF5	Q86Y56	Dynein assembly factor 5, axonemal	-	2,744335	-0,5189233
HPF1	Q9NWX4	Histone PARylation factor 1	-	2,759142	-0,5655177
RPL19	P84098	60S ribosomal protein L19	-	2,80368	-0,6604273
PRIM1	P49642	DNA primase small subunit	-	1,646433	-1,0644741
POLD2	P49005	DNA polymerase delta subunit 2	-	1,50723	-0,6128159
RPL35A	P18077	60S ribosomal protein L35a	-	1,615756	-0,7949567
SNRPC	P09234	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	-	1,403148	-0,5937161
HBS1L	Q9Y450	HBS1-like protein	-	1,807144	-0,6775048
WDHD1	O75717	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	-	1,67196	-0,6317351
RPL14	P50914	60S ribosomal protein L14	-	1,505401	-0,8365331
PRIM2	P49643	DNA primase large subunit	-	2,642762	-0,7497244
TTC4	Q95801	Tetratricopeptide repeat protein 4	-	3,074536	-0,5767865
BUD31	P41223	Protein BUD31 homolog	-	4,497448	-1,1095245
DHCR24	Q15392	Delta(24)-sterol reductase	-	2,452158	-0,6746426

PAK1IP1	Q9NWT1	p21-activated protein kinase-interacting protein 1	-	1,879552	-0,617528
PEG10	Q86TG7	Retrotransposon-derived protein PEG10	-	1,411771	-0,6782906
CCNH	P51946	Cyclin-H	-	2,077228	-0,7412033
BPHL	Q86WA6	Valacyclovir hydrolase	-	1,508462	-0,5154743
DHX57	Q6P158	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	-	1,401401	-0,6052749
PUM3	Q15397	Pumilio homolog 3	-	1,734415	-0,9276218
TMA16	Q96EY4	Translation machinery-associated protein 16	-	2,396471	-0,7716622
NOL6	Q9H6R4	Nucleolar protein 6	-	1,829455	-0,5519326
HAUS6	Q7Z4H7	HAUS augmin-like complex subunit 6	-	1,924841	-0,689568
MORF4L1	Q9UBU8	Mortality factor 4-like protein 1	-	2,038817	-0,5886502
POLD3	Q15054	DNA polymerase delta subunit 3	-	2,48836	-0,8033702
ARHGAP17	Q68EM7	Rho GTPase-activating protein 17	-	3,417281	-0,7324891
TSR1	Q2NL82	Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	-	1,336518	-1,0201204
PAWR	Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	-	2,840458	-0,8360658
CFAP20	Q9Y6A4	Cilia- and flagella-associated protein 20	-	1,758763	-1,1828504
BCAT2	O15382	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	-	1,65834	-0,5430276
CECR2	Q9BXF3	Cat eye syndrome critical region protein 2	-	2,019581	-0,9216459
GADD45GIP1	Q8TAE8	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	-	1,46335	-1,0665956
ORC4	O43929	Origin recognition complex subunit 4	-	3,601645	-0,662684
POLA1	P09884	DNA polymerase alpha catalytic subunit	-	2,624682	-0,5428973
RBM15B	Q8NDT2	Putative RNA-binding protein 15B	-	1,510707	-0,5394249
RNASEH2B	Q5TBB1	Ribonuclease H2 subunit B	-	2,786548	-0,8893332
NOL9	Q5SY16	Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase NOL9	-	2,006912	-0,5421278
ZNF423	Q2M1K9	Zinc finger protein 423	-	2,097397	-0,5188808
ZBTB10	Q96DT7	Zinc finger and BTB domain-containing protein 10	-	2,313927	-0,5375258
TRMT1L	Q7Z2T5	TRMT1-like protein	-	1,500338	-0,7257485
RTFDC1	Q9BY42	Replication termination factor 2	-	1,69464	-0,5859058
PIIG	Q13427	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G	-	2,522881	-0,6116991
TSC22D2	O75157	TSC22 domain family protein 2	-	1,427779	-0,6500889
RB1	P06400	Retinoblastoma-associated protein	-	2,020539	-0,9389803
KIF22	Q14807	Kinesin-like protein KIF22	-	1,702624	-0,5988209
TBC1D5	Q92609	TBC1 domain family member 5	-	1,644814	-0,5126297
PSPH	P78330	Phosphoserine phosphatase	-	1,612192	-0,7668941
PSMG1	O95456	Proteasome assembly chaperone 1	-	1,436929	-0,5445108
DPM1	O60762	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	-	2,902634	-1,0724683
SMAD3	P84022	Mothers against decapentaplegic homolog 3	-	2,074465	-1,0516068
JAM3	Q9BX67	Junctional adhesion molecule C	-	1,45784	-0,5307789
MAZ	P56270	Myc-associated zinc finger protein	-	2,485949	-1,0767226
SAMD4B	Q5PRF9	Protein Smaug homolog 2	-	1,770457	-0,5564406
PTPN13	Q12923	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	-	1,496891	-0,5938022
MED24	O75448	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 24	-	3,10365	-0,5291498
PUS1	Q9Y606	tRNA pseudouridine synthase A	-	1,382135	-0,518086
SRP19	P09132	Signal recognition particle 19 kDa protein	-	1,397973	-1,1452098
NMD3	Q96D46	60S ribosomal export protein NMD3	-	1,79238	-0,6961217
DNAJC19	Q96DA6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	-	1,946309	-0,5348198
ZMAT2	Q96NC0	Zinc finger matrix-type protein 2	-	3,468233	-0,9182935
RPS6KA1	Q15418	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	-	2,418402	-0,6576709
EBF1	Q9UH73	Transcription factor COE1	-	1,840092	-0,7247902
VPS13A	Q96RL7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	-	1,887011	-0,6978617
PLEKHA5	Q9HAU0	Pleckstrin homology domain-containing family A member 5	-	1,964086	-0,6323988
NIP7	Q9Y221	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	-	1,711459	-1,1639493
RPL34	P49207	60S ribosomal protein L34	-	1,824187	-0,7518466
GRN	P28799	Progranulin	-	1,771464	-2,1536748
MRRF	Q96E11	Ribosome-recycling factor, mitochondrial	-	1,756861	-0,5883496
GIN51	Q14691	DNA replication complex GINS protein PSF1	-	2,91137	-0,7005646
HELLS	Q9NRZ9	Lymphoid-specific helicase	-	2,537849	-0,6813576
TRAF2	Q12933	TNF receptor-associated factor 2	-	1,382586	-0,5630412
UTP18	Q9Y5J1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	-	2,48344	-0,9927201
PSMG2	Q969U7	Proteasome assembly chaperone 2	-	2,269885	-0,72769
ZNF281	Q9Y2X9	Zinc finger protein 281	-	1,335381	-0,531085
FBXO22	Q8NEZ5	F-box only protein 22	-	1,576736	-0,7096179
MRPS17	Q9Y2R5	28S ribosomal protein S17, mitochondrial	-	1,673369	-0,5214037
INTS4	Q96HW7	Integrator complex subunit 4	-	1,60722	-0,5061927
YY1	P25490	Transcriptional repressor protein YY1	-	2,85305	-1,1932883

DNMT3B	Q9UBC3	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B	-	1,350041	-2,0275307
RBM23	Q86U06	Probable RNA-binding protein 23	-	1,3362	-0,5556169
COX1	P00395	Cytochrome c oxidase subunit 1	-	1,394386	-0,9664344
HOXB4	P17483	Homeobox protein Hox-B4	-	2,943814	-0,9785631
KDM5B	Q9UGL1	Lysine-specific demethylase 5B	-	2,201324	-0,5997763
NFYA	P23511	Nuclear transcription factor Y subunit alpha	-	1,37023	-0,6358467
SURF4	O15260	Surfeit locus protein 4	-	1,698351	-0,7906106
HMG2	P05204	Non-histone chromosomal protein HMG-17	-	1,864569	-1,9400153
DNAJB6	O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	-	1,337049	-0,6972661
PN01	Q9NRX1	RNA-binding protein PNO1	-	1,83296	-1,27777
SCAF11	Q99590	Protein SCAF11	-	1,360492	-0,5509291
AGPAT4	Q9NRZ5	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase delta	-	1,668186	-0,5046438
DDX41	Q9UJV9	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	-	1,654808	-0,5026896
MIS18A	Q9NYP9	Protein Mis18-alpha	-	2,47066	-0,5750861
TP53RK	Q96S44	EKC/KEOPS complex subunit TP53RK	-	1,581166	-0,6473107
RARS2	Q5T160	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial	-	2,411356	-0,8052766
APOL2	Q9BQE5	Apolipoprotein L2	-	1,654783	-0,5778079
CEP85	Q6P2H3	Centrosomal protein of 85 kDa	-	1,43924	-0,7503097
DLG1	Q12959	Disks large homolog 1	-	2,678311	-0,5400814
ZMYM3	Q14202	Zinc finger MYM-type protein 3	-	2,22654	-1,7477105
EIF2D	P41214	Eukaryotic translation initiation factor 2D	-	2,041124	-0,6083661
PRKD3	O94806	Serine/threonine-protein kinase D3	-	1,850304	-0,5451083
GSTCD	Q8NEC7	Glutathione S-transferase C-terminal domain-containing protein	-	1,401888	-0,8473575
UTP6	Q9NYH9	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	-	2,005739	-0,5707099
MAP3K4	Q9Y6R4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	-	2,067785	-0,7966225
PAPOLG	Q9BWT3	Poly(A) polymerase gamma	-	2,797962	-0,6614821
PARD3	Q8TEW0	Partitioning defective 3 homolog	-	2,112569	-0,5587586
WNT7A	O00755	Protein Wnt-7a	-	1,712366	-0,8591771
ZEB2	O60315	Zinc finger E-box-binding homeobox 2	-	1,919279	-0,5950675
PDLIM7	Q9NR12	PDZ and LIM domain protein 7	-	1,742198	-0,8264475
MYO9B	Q13459	Unconventional myosin-IXb	-	1,519653	-0,5350246
CXorf56	Q9H5V9	UPF0428 protein CXorf56	-	1,908363	-0,7581906
RBM42	Q9BTD8	RNA-binding protein 42	-	2,139187	-1,5939124
USP3	Q9Y614	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	-	3,463514	-0,5629277
PIK3R4	Q99570	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	-	1,678464	-0,6900294
FANCD2	Q9BXW9	Fanconi anemia group D2 protein	-	2,062102	-0,5471914
OARD1	Q9Y530	ADP-ribose glycohydrolase OARD1	-	2,027993	-0,951591
AIF1L	Q9BQI0	Allograft inflammatory factor 1-like	-	1,442222	-0,6951101
ZNF706	Q9Y5V0	Zinc finger protein 706	-	1,670917	-1,1664159
INCENP	Q9NQS7	Inner centromere protein	-	2,735774	-0,5094419
MRPL16	Q9NX20	39S ribosomal protein L16, mitochondrial	-	2,469776	-0,6191232
NAT14	Q8WUY8	N-acetyltransferase 14	-	1,917387	-0,529355
INTS13	Q9NVM9	Integrator complex subunit 13	-	1,880494	-0,6957364
PHLDB2	Q86SQ0	Pleckstrin homology-like domain family B member 2	-	1,692906	-0,6689615
NLE1	Q9NVX2	Notchless protein homolog 1	-	2,40993	-0,6832869
EPC2	Q52LR7	Enhancer of polycomb homolog 2	-	1,508655	-0,8401446
CDK4	P11802	Cyclin-dependent kinase 4	-	1,730988	-0,6426308
LIG4	P49917	DNA ligase 4	-	3,523126	-0,501161
ZNF362	Q5T0B9	Zinc finger protein 362	-	1,824262	-0,7857389
UQCRCQ	O14949	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	-	2,669534	-0,5814576
PSTPIP2	Q9H939	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2	-	2,225019	-0,8583536
CGGBP1	Q9UFW8	CGG triplet repeat-binding protein 1	-	2,634337	-0,8358598
SLC1A5	Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	-	1,438356	-0,5749848
POLR3C	Q9BUI4	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3	-	2,427035	-0,6801989
CEP78	Q5JTW2	Centrosomal protein of 78 kDa	-	1,730325	-0,6776307
MSANTD2	Q6P1R3	Myb/SANT-like DNA-binding domain-containing protein 2	-	1,548859	-0,5148146
TMEM214	Q6NUQ4	Transmembrane protein 214	-	1,827392	-1,0372624
HM13	Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	-	1,530058	-0,5639629
SAC3D1	A6NKF1	SAC3 domain-containing protein 1	-	1,749804	-0,6124809
LHPP	Q9H008	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	-	1,718724	-0,7828355
	P82921	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	-	1,700515	-0,6138325
NSMCE3	Q96MG7	Non-structural maintenance of chromosomes element 3 homolog	-	2,112997	-1,1874878
ZC3H11B	A0A1B0G TU1	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11B	-	1,492357	-1,0119984

LRR41	Q15345	Leucine-rich repeat-containing protein 41	-	2,691503	-0,5288793
SMC5	Q8IY18	Structural maintenance of chromosomes protein 5	-	2,964935	-1,0590341
ZFC3H1	O60293	Zinc finger C3H1 domain-containing protein	-	2,063783	-0,7662287
KIN	O60870	DNA/RNA-binding protein KIN17	-	1,99849	-0,6367313
SEC11A	P67812	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	-	2,638691	-0,7486368
NSA2	O95478	Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog	-	1,895172	-0,5311539
KNTC1	P50748	Kinetochore-associated protein 1	-	1,865007	-0,5708041
ZKSCAN8	Q15776	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	-	2,147879	-0,5388107
TOE1	Q96GM8	Target of EGR1 protein 1	-	2,065822	-0,5937223
DSCC1	Q9BVC3	Sister chromatid cohesion protein ACC1	-	2,302263	-0,6972034
DHX40	Q8IX18	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX40	-	3,142752	-0,6589575
FADS1	O60427	Acyl-CoA (8-3)-desaturase	-	1,990207	-0,5577464
OXA1L	Q15070	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L	-	1,620565	-0,6018319
FNDC3B	Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	-	2,054727	-0,682564
SMPD4	Q9NXC4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4	-	1,992476	-0,9101602
QSER1	Q2KHR3	Glutamine and serine-rich protein 1	-	2,902756	-0,7128088
CRADD	P78560	Death domain-containing protein CRADD	-	2,150646	-0,5682526
ATE1	O95260	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	-	1,913671	-1,5945132
ZDHHC17	Q8IUH5	Palmitoyltransferase ZDHHC17	-	2,332914	-0,5771174
NUSAP1	Q9BXS6	Nucleolar and spindle-associated protein 1	-	1,678091	-0,562001
DOLK	Q9UPQ8	Dolichol kinase	-	2,340513	-0,5042944
HAUS2	Q9NVX0	HAUS augmin-like complex subunit 2	-	1,865459	-0,5274962
ZNF346	Q9UL40	Zinc finger protein 346	-	1,775816	-0,650631
CCNL2	Q96S94	Cyclin-L2	-	2,127889	-0,9689534
MSL3	Q8N5Y2	Male-specific lethal 3 homolog	-	1,81758	-1,0870891
CHEK1	O14757	Serine/threonine-protein kinase Chk1	-	2,198691	-0,9401162
MOB3B	Q86TA1	MOB kinase activator 3B	-	1,576381	-0,6344082
EYA3	Q99504	Eyes absent homolog 3	-	1,894506	-1,4182715
DHCR7	Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	-	2,163017	-1,2235023
CCNL1	Q9UK58	Cyclin-L1	-	1,482931	-0,6224951
UBAC2	Q8NBM4	Ubiquitin-associated domain-containing protein 2	-	1,839193	-0,582468
GALNT7	Q86SF2	N-acetylgalactosaminyltransferase 7	-	1,74008	-0,5024037
SENP7	Q9BQF6	Sentrin-specific protease 7	-	3,146152	-0,6046143
DHX35	Q9H5Z1	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX35	-	1,775148	-0,6022211
NFX1	Q12986	Transcriptional repressor NF-X1	-	3,324496	-1,3771832
EDF1	O60869	Endothelial differentiation-related factor 1	-	2,760394	-0,6295171
SEC61B	P60468	Protein transport protein Sec61 subunit beta	-	2,735044	-1,097285
HAUS5	O94927	HAUS augmin-like complex subunit 5	-	1,91522	-0,6993024
PIK3CB	P42338	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	-	1,965402	-0,6445934
TFAP2B	Q92481	Transcription factor AP-2-beta	-	1,791947	-0,6778796
GTPBP2	Q9BX10	GTP-binding protein 2	-	1,948495	-0,6514069
TMBIM6	P55061	Bax inhibitor 1	-	2,114186	-0,7996906
TADA2B	Q86TJ2	Transcriptional adapter 2-beta	-	3,314901	-1,0735539
UNG	P13051	Uracil-DNA glycosylase	-	1,72181	-0,6901808
TMEM68	Q96MH6	Transmembrane protein 68	-	2,915737	-0,6745676
SIGLEC1	Q9BZZ2	Sialoadhesin	-	1,686296	-0,53619
MAPK12	P53778	Mitogen-activated protein kinase 12	-	1,899839	-0,7592163
PAX6	P26367	Paired box protein Pax-6	-	2,246855	-1,0135188
DCAF13	Q9NV06	DDB1- and CUL4-associated factor 13	-	1,56017	-0,8462973
KIF16B	Q96L93	Kinesin-like protein KIF16B	-	1,789806	-0,5317183
ENC1	O14682	Ectoderm-neural cortex protein 1	-	2,60614	-0,7377242
EMC4	Q5J8M3	ER membrane protein complex subunit 4	-	1,569596	-0,6622362
ZBTB12	Q9Y330	Zinc finger and BTB domain-containing protein 12	-	2,580273	-0,5318213
DDX55	Q8NHQ9	ATP-dependent RNA helicase DDX55	-	1,573775	-0,7820764
MTG1	Q9BT17	Mitochondrial ribosome-associated GTPase 1	-	2,72203	-0,7120152
UTP20	O75691	Small subunit processome component 20 homolog	-	1,920347	-0,6801953
NSL1	Q96IY1	Kinetochore-associated protein NSL1 homolog	-	1,883298	-0,8187828
ZFP91	Q96JP5	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91	-	1,392655	-0,5551829
AP1S2	P56377	AP-1 complex subunit sigma-2	-	4,75023	-0,937542
SSR3	Q9UNL2	Translocon-associated protein subunit gamma	-	1,805533	-1,0259616
LRRD1	A4D1F6	Leucine-rich repeat and death domain-containing protein 1	-	1,525435	-0,7008448
KIF23	Q02241	Kinesin-like protein KIF23	-	1,606596	-0,9591351
FTSJ1	Q9UET6	Putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase	-	2,011781	-0,5868001
CCDC85C	A6NKD9	Coiled-coil domain-containing protein 85C	-	2,224026	-0,5209656
CACUL1	Q86Y37	CDK2-associated and cullin domain-containing protein 1	-	1,669429	-0,594784
CIP2A	Q8TCG1	Protein CIP2A	-	1,743887	-0,6215849

OTUD4	Q01804	OTU domain-containing protein 4	-	1,500629	-0,5097647
IFI16	Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16	-	1,526564	-0,9931319
MPG	P29372	DNA-3-methyladenine glycosylase	-	2,632434	-0,5284548
TMEM132B	Q14DG7	Transmembrane protein 132B	-	1,445753	-0,6596394
HCCS	P53701	Cytochrome c-type heme lyase	-	1,537634	-0,6624694
	Q96PV6	Leukocyte receptor cluster member 8	-	1,868592	-0,613622
PARG	Q86W56	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	-	2,488446	-0,5283875
HMGCR	P04035	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	-	1,749228	-0,8479686
TLK2	Q86UE8	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	-	2,065626	-0,891017
TTI2	Q6NXR4	TELO2-interacting protein 2	-	2,73276	-0,7984838
ELF2	Q15723	ETS-related transcription factor Elf-2	-	2,049182	-0,823446
IFT81	Q8WYA0	Intraflagellar transport protein 81 homolog	-	2,444836	-0,6871004
ACTR8	Q9H981	Actin-related protein 8	-	1,686537	-0,8085313
POP5	Q969H6	Ribonuclease P/MRP protein subunit POP5	-	2,341972	-0,9912269
CNTRL	Q7Z7A1	Centriolin	-	2,65398	-0,6666307
UHRF2	Q96PU4	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF2	-	1,545455	-0,8526838
SPICE1	Q8N0Z3	Spindle and centriole-associated protein 1	-	2,602462	-0,5240793
NEDD4	P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	-	2,189904	-0,5672579
GTF2H2	Q13888	General transcription factor IIH subunit 2	-	1,467442	-0,6775386
RHPN2	Q8IUC4	Rhopilin-2	-	2,227933	-0,7580848
MAST2	Q6P0Q8	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	-	1,480071	-0,52092
TRMT5	Q32P41	tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase	-	2,115547	-0,5180347
SEC62	Q99442	Translocation protein SEC62	-	1,679632	-0,6044421
HS2ST1	Q7LGA3	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	-	2,199881	-0,891283
FAM83H	Q6ZRV2	Protein FAM83H	-	1,61063	-0,7220001
JAKMIP1	Q96N16	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	-	2,715977	-0,5700006
C7orf31	Q8N865	Uncharacterized protein C7orf31	-	1,923206	-0,7466328
ARAP1	Q96P48	Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	-	1,646704	-0,7325969
PGM5	Q15124	Phosphoglucomutase-like protein 5	-	1,847449	-0,6976779
ANKRD36	A6QL64	Ankyrin repeat domain-containing protein 36A	-	1,874028	-0,5884852
WDR19	Q8NEZ3	WD repeat-containing protein 19	-	2,537256	-0,7197356
SERF2	P84101	Small EDRK-rich factor 2	-	1,510877	-1,0109119
MRPS24	Q96EL2	28S ribosomal protein S24, mitochondrial	-	1,731788	-0,7566624
RIOK2	Q9BVS4	Serine/threonine-protein kinase RIO2	-	1,393198	-0,5012403
KIAA0319L	Q8IZA0	Dyslexia-associated protein KIAA0319-like protein	-	1,614428	-0,535109

Anexo 2: Lista de proteínas diferenciais do estudo do neurodesenvolvimento em organoides cerebrais. (continua)

Gene	Acesso Uniprot	Descrição	-log p-value
TSTD1	Q8NFU3	Isoform 4 of Thiosulfate:glutathione sulfurtransferase	1,595397418
CCS	O14618	Copper chaperone for superoxide dismutase	1,950727193
SERPINH1	P50454	Serpin H1	2,040638795
TPD52L2	O43399	Isoform 3 of Tumor protein D54	2,655061935
AAMDC	Q9H7C9	Mth938 domain-containing protein	3,539045886
CALR	P27797	Calreticulin	1,644674622
CDC37	Q16543	Hsp90 co-chaperone Cdc37	1,810059877
NUMA1	Q14980	Isoform 2 of Nuclear mitotic apparatus protein 1	2,491184857
HNRNPM	P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	2,412320609
HSPA5	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	4,403682708
SCAMP1	O15126	Secretory carrier-associated membrane protein 1	1,665898066
CBX5	P45973	Chromobox protein homolog 5	2,835850837
JPT2	Q9H910	Isoform 3 of Jupiter microtubule associated homolog 2	1,472784289
RBM14	Q96PK6	Isoform 5 of RNA-binding protein 14	1,831733921
WASHC3	Q9Y3C0	WASH complex subunit 3	1,335873271
NASP	P49321	Isoform 3 of Nuclear autoantigenic sperm protein	4,687279319
BCL2L2	Q92843	Isoform 3 of Bcl-2-like protein 2	2,548049401
MCM2	P49736	DNA replication licensing factor MCM2	1,732699407
RPSA	P08865	40S ribosomal protein SA	1,563777716
ILF2	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	1,368725622
U2AF2	P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	2,962220805
TARDBP	Q13148	TAR DNA-binding protein 43	1,539904612
SET	Q01105	Protein SET	2,597842213
PLS3	P13797	Plastin-3	3,538287343
CRABP2	P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2	2,768593933
DDAH2	O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1,921837726
ARFGAP1	Q8N6T3	Isoform 2 of ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1	1,664982187
NCOA5	Q9HCD5	Nuclear receptor coactivator 5	2,510927269
PTBP1	P26599	Isoform 3 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	2,271646054
HNRNPA3	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2,003310503
DNAJC17	Q9NVM6	DnaJ homolog subfamily C member 17	1,539992809
CPSF6	Q16630	Isoform 2 of Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	2,578326577
HNRNPK	P61978	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3,345939392
KHSRP	Q92945	Far upstream element-binding protein 2	2,847603575
IGF2BP1	Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	1,735018018
GAPDH	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,868578351
PDIA6	Q15084	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	2,288628389
CRABP1	P29762	Cellular retinoic acid-binding protein 1	1,999735201
PCNP	Q8WW12	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	2,091552145
SEPTIN2	Q15019	Isoform 2 of Septin-2	1,312368597
PDIA4	P13667	Protein disulfide-isomerase A4	1,769243976
DCXR	Q7Z4W1	L-xylulose reductase	1,711792058
ECHDC1	Q9NTX5	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	1,356606959
AKR7A2	O43488	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	3,027769747
PRDX1	Q06830	Peroxiredoxin-1	3,478679113
SUGT1	Q9Y2Z0	Protein SGT1 homolog	3,200076361
FKBP4	Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	4,9693389
MAP1LC3B2	A6NCE7	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2	1,403129192
ABI2	Q9NYB9	Abl interactor 2	1,524142527
SRRM2	Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	1,593577537
RBM14	Q96PK6	RNA-binding protein 14	1,369745001
PCBP1	Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	1,403426405
PABPC1	P11940	Polyadenylate-binding protein 1	3,750681893
CNPY3	Q9BT09	Protein canopy homolog 3	2,177993225
SRSF3	P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3	1,676146024
AK2	P54819	Adenylate kinase 2, mitochondrial	1,66047938
HNRNPH1	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	1,957009989
ELAVL1	Q15717	Isoform 2 of ELAV-like protein 1	3,839207232
HSPA1B	P0DMV9	Heat shock 70 kDa protein 1B	2,44731515
HNRNPA2B1	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1,440198154
TXN	P10599	Thioredoxin	1,688966016
HMGB2	P26583	High mobility group protein B2	1,81019943
SNRPB2	P08579	U2 small nuclear ribonucleoprotein B"	1,883738605

EIF5	P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5	2,32139651
CAST	P20810	Isoform 6 of Calpastatin	1,645111715
MIF	P14174	Macrophage migration inhibitory factor	3,878108603
CSRP2	Q16527	Cysteine and glycine-rich protein 2	3,159171392
RPL23	P62829	60S ribosomal protein L23	2,952997615
TRH	P20396	Pro-thyrotropin-releasing hormone	2,149124857
RPS13	P62277	40S ribosomal protein S13	3,270322486
RBM8A	Q9Y5S9	RNA-binding protein 8A	3,032648768
YWHAZ	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	2,579366204
EEF1A1	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	3,713580454
YWHAQ	P27348	14-3-3 protein theta	4,11198651
TUBA4A	P68366	Tubulin alpha-4A chain	3,081485391
CDK5RAP3	Q96JB5	Isoform 4 of CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	2,261755328
AFP	P02771	Alpha-fetoprotein	5,417283011
TUBAL3	A6NHL2	Tubulin alpha chain-like 3	2,910416487
EEF2	P13639	Elongation factor 2	6,379186743
CYFIP1	Q7L576	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	1,619714657
RPL4	P36578	60S ribosomal protein L4	4,077044968
RPL13A	P40429	60S ribosomal protein L13a	1,628068551
PRPSAP2	O60256	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	1,869330596
GPS1	Q13098	Isoform 2 of C	1,366106945
PPP2CA	P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	1,501069265
EDC4	Q6P2E9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	1,465815366
PSMB5	P28074	Proteasome subunit beta type-5	3,904600488
CTNND1	O60716	Catenin delta-1	1,643026233
RAB7A	P51149	Ras-related protein Rab-7a	1,668060286
SDHA	P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	1,428001002
FAM114A1	Q8IWE2	Protein N	1,544258589
CIRBP	Q14011	Isoform 2 of Cold-inducible RNA-binding protein	2,153702086
H1-3	P16402	Histone H1.3	1,342567838
RBM3	P98179	RNA-binding protein 3	3,634006683
RNMT	O43148	Isoform 2 of mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	2,264819591
HNRNPR	O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	2,137131324
SUB1	P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	1,388014535
RELA	Q04206	Transcription factor p65	4,323515526
RPS27A	P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	2,931846233
ANXA2	P07355	Isoform 2 of Annexin A2	2,698462057
FABP1	P07148	Fatty acid-binding protein, liver	1,760095833
UCHL5	Q9Y5K5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	2,160538023
ZSWIM8	A7E2V4	Isoform 2 of Zinc finger SWIM domain-containing protein 8	1,680879992
SNRPD2	P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	2,328241404
COL6A3	P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	1,87833161
LDHA	P00338	Isoform 3 of L-lactate dehydrogenase A chain	3,201712901
COL1A1	P02452	Collagen alpha-1(I) chain	1,649328316
S100A11	P31949	Protein S100-A11	3,322511333
NME4	O00746	Nucleoside diphosphate kinase, mitochondrial	5,218463702
COL3A1	P02461	Collagen alpha-1(III) chain	2,174191521
HNRNPA0	Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	1,58972357
H1-5	P16401	Histone H1.5	2,039656431
NUDT16	Q96DE0	U8 snoRNA-decapping enzyme	2,566207536
PQBP1	O60828	Polyglutamine-binding protein 1	2,085670029
TBCA	O75347	Tubulin-specific chaperone A	1,670909887
HDGF	P51858	Hepatoma-derived growth factor	2,15715729
TPM4	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	2,426033599
OXR1	Q8N573		3,158769191
PGM5	Q15124	Phosphoglucosyltransferase-like protein 5	1,84973534
PRDX2	P32119	Peroxiredoxin-2	1,56221235
CNPY4	Q8N129	Protein canopy homolog 4	2,733974118
PSMD4	P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	2,341409747
PDCD5	O14737	Programmed cell death protein 5	5,228422689
ST13	P50502	Hsc70-interacting protein	1,947450991
RAN	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	1,909018604
HSPH1	Q92598	Heat shock protein 105 kDa	4,55820361
STIP1	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	4,457568341
HNRNPH3	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	3,628449554
MDH2	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2,129811687
LDHB	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	1,34788945
CCT2	P78371	T-complex protein 1 subunit beta	1,452027496
HSP90AA1	P07900	Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	1,693160127
HNRNPL	P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	2,196207219

TRIM67	Q6ZTA4	Isoform 2 of Tripartite motif-containing protein 67	1,32379595
EC11	P42126	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	1,653973516
MVD	P53602	Diphosphomevalonate decarboxylase	3,565469103
PFN2	P35080	Isoform IIb of Profilin-2	3,179554787
PDHB	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	2,416290565
ECH1	Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	1,699630153
ETF A	P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	4,403787197
EPB41L3	Q9Y2J2	Isoform 2 of Band 4.1-like protein 3	2,185797351
TKT	P29401	Isoform 2 of Transketolase	3,608319356
UQCRB	P14927	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	2,33618974
TPP1	O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	1,767593006
GET3	O43681	ATPase ASNA1	2,748070315
ATP5F1B	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5,673582846
WBP2	Q969T9	WW domain-binding protein 2	4,31159602
H2BC18	Q5QNW6	Isoform 2 of Histone H2B type 2-F	1,601849553
ENO1	P06733	Alpha-enolase	2,225968446
ERP29	P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	1,69808815
HSPA8	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	1,647232494
TPPP3	Q9BW30	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	1,396166054
HSPA9	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	5,62722989
RPS7	P62081	40S ribosomal protein S7	2,58122159
PFN1	P07737	Profilin-1	2,032611494
SHTN1	A0MZ66	Isoform 3 of Shootin-1	1,63595648
HSPB1	P04792	Heat shock protein beta-1	1,730714745
FAM157C	P0CG43	Putative protein FAM157C	1,441524525
HSPD1	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,173775037
NUP214	P35658	Isoform 5 of Nuclear pore complex protein Nup214	2,928914134
LGALS1	P09382	Galectin-1	2,98982917
RTN3	O95197	Reticulon-3	3,473267806
GLUD1	P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	3,672226815
MXRA7	P84157	Matrix-remodeling-associated protein 7	1,75220646
RAC1	P63000	Isoform B of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1,786787058
ATP1A1	P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	3,055859027
PPOX	P50336	Protoporphyrinogen oxidase	1,661765674
DYNC1H1	Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	2,727162191
NCSTN	Q92542	Nicastrin	2,853979065
ACTR1B	P42025	Beta-centractin	2,474026138
PCSK1N	Q9UHG2	ProSAAS	2,147995616
DCX	O43602	Neuronal migration protein doublecortin	1,86664762
GANAB	Q14697	Isoform 2 of Neutral alpha-glucosidase AB	1,426343854
FABP7	O15540	Isoform 2 of Fatty acid-binding protein, brain	5,370390074
LGALS3	P17931	Galectin-3	4,119214443
NAGK	Q9UJ70	Isoform 2 of N-acetyl-D-glucosamine kinase	3,004532611
SRI	P30626	Sorcin	2,812771404
SRR	Q9GZT4	Serine racemase	3,477835674
LAMP2	P13473	Isoform LAMP-2C of Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	3,754256611
SGSH	P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	1,499930689
MYLPF	Q96A32	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	2,133078572
MYL1	P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	2,47363669
ACTC1	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1	2,666529164
PBXIP1	Q96AQ6	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	3,300240392
INA	Q16352	Alpha-internexin	1,677189297
ANXA6	P08133	Annexin A6	1,8669967
DPYSL3	Q14195	Isoform LCRMP-4 of Dihydropyrimidinase-related protein 3	7,640330025
PLEC	Q15149	Isoform 3 of Plectin	2,419733385
RBP1	P09455	Retinol-binding protein 1	1,395079984
LMNA	P02545	Prelamin-A/C	5,491448895
CAPS	Q13938	Isoform 3 of Calcyphosin	2,667109802
RUFY3	Q7L099	Isoform 3 of Protein RUFY3	1,30931279
ADD2	P35612	Beta-adducin	4,578432803
MT3	P25713	Metallothionein-3	2,003339213
APOO	Q9BUR5	MIC	1,911006787
GNS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	5,070429713
TPD52L1	Q16890	Tumor protein D53	2,992103134
EEF1A2	Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	1,940476561
SEPTIN3	Q9UH03	Neuronal-specific septin-3	2,365635367
CRMP1	Q14194	Isoform LCRMP-1 of Dihydropyrimidinase-related protein 1	3,698981652
VDAC2	P45880	Isoform 1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1,369389068
BCAP31	P51572	Isoform 2 of B-cell receptor-associated protein 31	1,799313214
TUBB3	Q13509	Tubulin beta-3 chain	3,714502836
SOD2	P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	1,809907266
UQCRQ	O14949	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	1,68596142

ANXA4	P09525	Annexin A4	3,029556494
TUBB4A	P04350	Tubulin beta-4A chain	2,141856671
ATP5F1C	P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	4,217603933
RTN4	Q9NQC3	Reticulon-4	2,162344278
ARL8A	Q96BM9	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	1,369923787
GNAO1	P09471	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	2,962705833
PGRMC2	O15173	Isoform 2 of Membrane-associated progesterone receptor component 2	7,033002092
SPTBN1	Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	1,41818912
TUBB2A	Q13885	Tubulin beta-2A chain	1,374465808
AFDN	P55196	Isoform 2 of Afadin	1,670206318
RRAGB	Q5VZM2	Isoform 2 of Ras-related GTP-binding protein B	1,386376779
CSTB	P04080	Cystatin-B	1,561449392
PCBD1	P61457	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	1,702422549
FH	P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	2,808329971
PAFAH1B3	Q15102	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	2,086294126
SUCLG1	P53597	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	2,221997349
PHB2	Q99623	Prohibitin-2	1,966675497
CLIC6	Q96NY7	Chloride intracellular channel protein 6	1,541534376
CRYAB	P02511	Alpha-crystallin B chain	2,457912926
UCHL1	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	1,995896195
TAGLN2	P37802	Isoform 2 of Transgelin-2	2,065244838
ALDOC	P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	4,673339611
CALB2	P22676	Calretinin	2,538603417
GOT2	P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	3,684183922
MAP1B	P46821	Microtubule-associated protein 1B	1,648611559
TMSB4X	P62328	Thymosin beta-4	1,890328149
OPHN1	O60890		1,618654627
PRDX3	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	3,65389122
ELAVL3	Q14576	ELAV-like protein 3	1,842354525
MAOA	P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A	2,238021492
PDLIM3	Q53GG5	Isoform 2 of PDZ and LIM domain protein 3	1,432211077
HDHD3	Q9BSH5	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	2,365153167
PGAM1	P18669	Phosphoglycerate mutase 1	1,880010072
TPPP	O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	1,676749543
CA2	P00918	Carbonic anhydrase 2	6,047593546
ACADVL	P49748	Isoform 3 of Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	5,127541188
SOD1	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2,389242567
ATP5F1A	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1,737206594
EPB41L1	Q9H4G0	Band 4.1-like protein 1	4,268869927
MDH1	P40925	Isoform 3 of Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2,05908913
SLC25A3	Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	2,506612386
CLTC	Q00610	Clathrin heavy chain 1	2,168669098
GOT1	P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	1,494448651
TUBB6	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	5,424556429
ATP5ME	P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial	1,971542386
ARF3	P61204	ADP-ribosylation factor 3	1,661479364
TTR	P02766	Transthyretin	1,584511388
CLU	P10909	Isoform 2 of Clusterin	3,962916916
AIFM1	O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	2,602566317
GDI1	P60028	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	2,528675448
UQCRC2	P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	2,326587603
TUBB2B	Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	1,736717767

Anexo 3: Lista de proteínas diferenciais do estudo da disgenesia do corpo caloso em organoides cerebrais, comparando organoides ACC com organoides de 45 dias.

(continua)

Gene	Acesso Uniprot	Descrição	ACC/45 dias	-log p-value
XRCC6	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	+	1,82465
CCT7	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	+	4,020766
RAN	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	+	2,054959
ELAVL1	Q15717	ELAV-like protein 1	+	2,598626
RDX	P35241	Radixin	+	1,971739
GTF2I	P78347	General transcription factor II-I	+	2,641577
HDGF	P51858	Hepatoma-derived growth factor	+	1,674694
GPI	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	+	3,304592
FKBP4	Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	+	3,535281
DDX23	Q9BUQ8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	+	1,951363
SCRN1	Q12765	Secernin-1	+	2,383333
DNM1	Q05193	Dynamin-1	+	1,638155
SH3GL1	Q99961	Endophilin-A2	+	2,399766
CTBP2	P56545	C-terminal-binding protein 2	+	2,130317
BUB3	O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	+	1,717112
DNAJC8	O75937	DnaJ homolog subfamily C member 8	+	1,75601
RNH1	P13489	Ribonuclease inhibitor	+	3,002552
CAD	P27708	CAD protein	+	3,352132
LUC7L	Q9NQ29	Putative RNA-binding protein Luc7-like 1	+	2,178063
RPS17	P08708	40S ribosomal protein S17	+	3,576846
STRBP	Q96S19	Spermatid perinuclear RNA-binding protein	+	1,992888
USP7	Q93009	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	+	2,946105
SRP9	P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	+	2,843847
SORD	Q00796	Sorbitol dehydrogenase	+	2,173715
EIF3E	P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	+	2,33592
LSM4	Q9Y4Z0	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	+	2,347904
CAT	P04040	Catalase	+	2,930386
ARPP19	P56211	cAMP-regulated phosphoprotein 19	+	2,014931
NAA10	P41227	N-alpha-acetyltransferase 10	+	1,312136
RTN3	O95197	Reticulon-3	+	2,509205
KHDRBS3	O75525	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	+	2,580734
IGLON5	A6NGN9	IgLON family member 5	+	1,806907
WNK1	Q9H4A3	Serine/threonine-protein kinase WNK1	+	1,79405
BLMH	Q13867	Bleomycin hydrolase	+	2,799481
LSM6	P62312	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	+	2,325034
KHDRBS2	Q5VWX1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2	+	1,835121
DRAP1	Q14919	Dr1-associated corepressor	+	2,085077
NUP98	P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	+	1,497159
CHMP1A	Q9HD42	Charged multivesicular body protein 1a	+	1,359891
NXF1	Q9UBU9	Nuclear RNA export factor 1	+	2,218224
NHLRC3	Q5JS37	NHL repeat-containing protein 3	+	1,535816
ZC3H11A	O75152	Zinc finger CCH domain-containing protein 11A	+	1,963954
UBE2O	Q9C0C9	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme	+	1,919288
MTREX	P42285	Exosome RNA helicase MTR4	+	1,742614
SNX27	Q96L92	Sorting nexin-27	+	1,827288
ATXN2	Q99700	Ataxin-2	+	3,724412
PBX1	P40424	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	+	1,628638
SHOC2	Q9UQ13	Leucine-rich repeat protein SHC-2	+	2,519798
ACAD9	Q9H845	Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial	+	1,397654
NAV1	Q8NEY1	Neuron navigator 1	+	2,317922
TAF10	Q12962	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	+	2,056963
VPS52	Q8N1B4	Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog	+	2,445213
CPSF3	Q9UKF6	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	+	1,932629
NUDCD1	Q96RS6	NudC domain-containing protein 1	+	2,810468
TM7SF2	O76062	Delta(14)-sterol reductase TM7SF2	+	1,545145
DENND10	Q8TCE6	DENN domain-containing protein 10	+	1,759161
LMCD1	Q9NZU5	LIM and cysteine-rich domains protein 1	+	1,806785
WDR26	Q9H7D7	WD repeat-containing protein 26	+	1,705567
CUTC	Q9NTM9	Copper homeostasis protein cutC homolog	+	2,621302
METAP1	P53582	Methionine aminopeptidase 1	+	1,619574
EZR	P15311	Ezrin	-	1,490197

H2AW	Q7L7L0	Histone H2A type 3	-	1,734276
PLIN3	O60664	Perilipin-3	-	1,361978
SEPTIN9	Q9UHD8	Septin-9	-	3,916179
YBX1	P67809	Y-box-binding protein 1	-	2,762872
FLOT1	O75955	Flotillin-1	-	1,70283
SOD1	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	-	1,772416
OXSR1	O95747	Serine/threonine-protein kinase SR1	-	1,963449
MAPK3	P27361	Mitogen-activated protein kinase 3	-	2,666977
MPST	P25325	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	-	3,528957
LETM1	O95202	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	-	1,751165
MAPRE3	Q9UPY8	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	-	2,200926
PANK4	Q9NVE7	4'-phosphopantetheine phosphatase	-	1,520205
WARS1	P23381	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	-	1,537608
PGRMC2	O15173	Membrane-associated progesterone receptor component 2	-	1,975284
RPS13	P62277	40S ribosomal protein S13	-	2,402732
PSME3	P61289	Proteasome activator complex subunit 3	-	2,230745
COPS8	Q99627	CP9 signalosome complex subunit 8	-	2,902669
CLIP1	P30622	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	-	1,658531
GABARAPL2	P60520	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	-	1,981421
CLNS1A	P54105	Methylosome subunit pICln	-	2,763924
KYAT3	Q6YP21	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3	-	1,438499
NFS1	Q9Y697	Cysteine desulfurase, mitochondrial	-	2,091984
NUP133	Q8WUM0	Nuclear pore complex protein Nup133	-	1,953829
CISD1	Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	-	1,906363
PTGR2	Q8N8N7	Prostaglandin reductase 2	-	1,715943
PSME3IP1	Q9GZU8	PSME3-interacting protein	-	1,58144
GFUS	Q13630	GDP-L-fucose synthase	-	1,662422
PPP1R21	Q6ZMI0	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 21	-	2,779347
AAK1	Q2M2I8	AP2-associated protein kinase 1	-	2,399368
CIAO2A	Q9H5X1	Cytosolic iron-sulfur assembly component 2A	-	2,180137
SH3KBP1	Q96B97	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	-	1,840102
MTHFD1L	Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	-	1,940956
PHLDB1	Q86UU1	Pleckstrin homology-like domain family B member 1	-	1,331306
TNNI1	P19237	Troponin I, slow skeletal muscle	-	2,269774
APPL2	Q8NEU8	ACC-interacting protein 13-beta	-	1,488641
FAU	P62861	40S ribosomal protein S30	-	1,578067
GPALPP1	Q8IXQ4	GPALPP motifs-containing protein 1	-	2,248878
CISD2	Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	-	1,974312
KIAA0930	Q6ICG6	Uncharacterized protein KIAA0930	-	1,805511
EIF2AK4	Q9P2K8	eIF-2-alpha kinase GCN2	-	1,881045

Anexo 4: Lista de proteínas diferenciais do estudo da disgenesia do corpo caloso em organoides cerebrais, comparando organoides ACC com organoides de 60 dias.
(continua)

Gene	Acesso Uniprot	Descrição	ACC/60 dias	-log p-value
EEF2	P13639	Elongation factor 2	+	1,606784
HNRNPC	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	+	3,204097
HNRNPU	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	+	1,912761
FSCN1	Q16658	Fascin	+	2,190866
CAND1	Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	+	1,412149
RPSA	P08865	40S ribosomal protein SA	+	1,754618
DDX5	P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	+	1,635889
GTF2I	P78347	General transcription factor II-I	+	2,641577
GPI	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	+	3,304592
SF3B3	Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	+	1,912702
SEPTIN9	Q9UHD8	Septin-9	+	3,916179
DDX23	Q9BUQ8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	+	1,951363
CAPRIN1	Q14444	Caprin-1	+	2,031771
PRPF8	Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	+	1,637197
AK3	Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	+	2,408688
CTBP2	P56545	C-terminal-binding protein 2	+	2,130317
BUB3	O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	+	1,717112
RNH1	P13489	Ribonuclease inhibitor	+	3,002552
CAD	P27708	CAD protein	+	3,352132
NUP93	Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93	+	1,51747
PSMB7	Q99436	Proteasome subunit beta type-7	+	3,062616
USP7	Q93009	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	+	2,946105
SRP9	P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	+	2,843847
SORD	Q00796	Sorbitol dehydrogenase	+	2,173715
EIF3E	P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	+	2,33592
CACNA2D1	P54289	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	+	2,074144
MEAK7	Q6P9B6	MTOR-associated protein MEAK7	+	1,473932
CAT	P04040	Catalase	+	2,930386
ARPP19	P56211	cAMP-regulated phosphoprotein 19	+	2,014931
RTN3	O95197	Reticulon-3	+	2,509205
KHDRBS3	O75525	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	+	2,580734
EXOSC4	Q9NPD3	Exosome complex component RRP41	+	3,073105
LSM6	P62312	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	+	2,325034
KHDRBS2	Q5VWX1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2	+	1,835121
SNRPF	P62306	Small nuclear ribonucleoprotein F	+	2,372058
POLR2A	P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	+	3,204724
NXF1	Q9UBU9	Nuclear RNA export factor 1	+	2,218224
NHLRC3	Q5JS37	NHL repeat-containing protein 3	+	1,535816
EXOSC6	Q5RKV6	Exosome complex component MTR3	+	3,265471
ZC3H11A	O75152	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	+	1,963954
PCM1	Q15154	Pericentriolar material 1 protein	+	3,4964
MTREX	P42285	Exosome RNA helicase MTR4	+	1,742614
IGBP1	P78318	Immunoglobulin-binding protein 1	+	1,642457
SNX27	Q96L92	Sorting nexin-27	+	1,827288
TRMT1	Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	+	1,633937
CHAMP1	Q96JM3	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	+	1,97616
STRIP1	Q5VSL9	Striatin-interacting protein 1	+	1,425418
VWA5A	O00534	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A	+	2,564399
TAOK1	Q7L7X3	Serine/threonine-protein kinase TAO1	+	2,281814
MT-CO2	P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	+	1,879463
ATP6AP1	Q15904	V-type proton ATPase subunit S1	+	1,780508
SHOC2	Q9UQ13	Leucine-rich repeat protein SHOC-2	+	2,519798
PEG10	Q86TG7	Retrotransposon-derived protein PEG10	+	2,491304
NAV1	Q8NEY1	Neuron navigator 1	+	2,317922
TAF10	Q12962	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	+	2,056963
TM7SF2	O76062	Delta(14)-sterol reductase TM7SF2	+	1,545145
POLD3	Q15054	DNA polymerase delta subunit 3	+	2,513379
FOXRED1	Q96CU9	FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1	+	1,613382
MLLT11	Q13015	Protein AF1q	+	2,073862
EPHA4	P54764	Ephrin type-A receptor 4	+	1,541635
SYNRG	Q9UMZ2	Synergina gamma	+	2,224168

ZNF579	Q8NAF0	Zinc finger protein 579	+	2,683811
ATP5F1B	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	-	1,635949
ATP5F1A	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	-	1,711135
VDAC1	P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	-	1,839991
ST13	P50502	Hsc70-interacting protein	-	2,303572
H2AZ2	Q71UI9	Histone H2A.V	-	1,499383
FH	P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	-	2,291143
PDHB	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	-	3,519164
MAP4	P27816	Microtubule-associated protein 4	-	2,008207
PCMT1	P22061	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate)	-	1,765916
HADH	Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	-	1,452695
ALDH9A1	P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	-	2,454679
CYCS	P99999	Cytochrome c	-	4,471763
LAP3	P28838	Cytosol aminopeptidase	-	2,68528
ATP5PB	P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	-	2,76173
FTTH1	P02794	Ferritin heavy chain	-	1,940427
DBNL	Q9UJU6	Drebrin-like protein	-	2,038923
RPS17	P08708	40S ribosomal protein S17	-	3,576846
LSM12	Q3MHD2	Protein LSM12 homolog	-	3,637373
ECI2	O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2	-	1,604783
PFDN4	Q9NQP4	Prefoldin subunit 4	-	1,545672
NAXD	Q8IW45	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	-	1,765037
HEXA	P06865	Beta-hexosaminidase subunit alpha	-	3,06031
PPA2	Q9H2U2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	-	2,390541
APRT	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	-	1,463696
COPS8	Q99627	COP9 signalosome complex subunit 8	-	2,902669
SLC25A24	Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	-	2,759978
SULF1	Q8IWU6	Extracellular sulfatase Sulf-1	-	1,868005
ISCU	Q9H1K1	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial	-	2,341391
COA3	Q9Y2R0	Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	-	1,386294
NUP133	Q8WUM0	Nuclear pore complex protein Nup133	-	1,953829
PDLIM3	Q53GG5	PDZ and LIM domain protein 3	-	1,531204
AGFG1	P52594	Arf-GAP domain and FG repeat-containing protein 1	-	2,018988
GGACT	Q9BVM4	Gamma-glutamylaminecyclotransferase	-	2,014404
NMT1	P30419	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	-	1,826951
GCLC	P48506	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	-	2,603133
SEPTIN10	Q9P0V9	Septin-10	-	1,962586
LARP7	Q4G0J3	La-related protein 7	-	2,851608
MTHFD1L	Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	-	1,940956
ATXN2	Q99700	Ataxin-2	-	3,724412
DCTD	P32321	Deoxycytidylate deaminase	-	2,185569
RAB11FIP1	Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1	-	1,567239
RTL8C	A6ZKI3	Retrotransposon Gag-like protein 8C	-	2,366585
SIRT3	Q9NTG7	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3, mitochondrial	-	1,70018
VPS13C	Q709C8	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	-	1,99018
CUTC	Q9NTM9	Copper homeostasis protein cutC homolog	-	2,621302
PELP1	Q8IZL8	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	-	3,871626
STX17	P56962	Syntaxin-17	-	2,108185
EIF2AK4	Q9P2K8	eIF-2-alpha kinase GCN2	-	1,881045
NPTN	Q9Y639	Neuroplastin	-	2,089233

Anexo 5: Lista de proteínas diferenciais do estudo da disgenesia do corpo caloso em organoides cerebrais, comparando organoides ACC com organoides de 75 dias.
(continua)

Gene	Acesso Uniprot	Description	ACC/75 dias	-log p-value
HNRNPC	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	+	3,204096829
FSCN1	Q16658	Fascin	+	2,190865915
DPYSL5	Q9BPU6	Dihydropyrimidinase-related protein 5	+	1,433503467
NUMA1	Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	+	1,459594562
CCT7	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	+	4,020765623
HNRNPH3	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	+	2,128465958
MATR3	P43243	Matrin-3	+	1,561854813
RAN	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	+	2,054958884
RPSA	P08865	40S ribosomal protein SA	+	1,754617674
DDX5	P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	+	1,635888872
GTF2I	P78347	General transcription factor II-I	+	2,64157734
HDGF	P51858	Hepatoma-derived growth factor	+	1,674693758
GPI	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	+	3,304591947
FKBP4	Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	+	2,109874511
SPTBN2	O15020	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	+	1,342145084
ACLY	P53396	ATP-citrate synthase	+	1,787721351
SMARCC2	Q8TAQ2	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	+	1,71704906
DDX23	Q9BUQ8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	+	1,951363438
FUBP3	Q96I24	Far upstream element-binding protein 3	+	2,109874511
EIF3C	Q99613	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	+	2,410075043
CAPRIN1	Q14444	Caprin-1	+	2,03177095
RAB1B	Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	+	1,767192485
PRPF8	Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	+	1,637196985
AK3	Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	+	2,408687527
CSE1L	P55060	Exportin-2	+	1,623926333
CTBP2	P56545	C-terminal-binding protein 2	+	2,130317195
DNAJC8	O75937	DnaJ homolog subfamily C member 8	+	1,756010394
RNH1	P13489	Ribonuclease inhibitor	+	3,002551787
MCM4	P33991	DNA replication licensing factor MCM4	+	1,436325783
CAD	P27708	CAD protein	+	3,352132337
LUC7L	Q9NQ29	Putative RNA-binding protein Luc7-like 1	+	2,178062756
NUP93	Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93	+	1,517470245
EIF2S3	P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	+	1,40956087
PSMB7	Q99436	Proteasome subunit beta type-7	+	3,062616202
KARS1	Q15046	Lysine--tRNA ligase	+	1,37392865
USP7	Q93009	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	+	2,946105087
SMARCA5	O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	+	1,692087311
SRP9	P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	+	2,843847118
SORD	Q00796	Sorbitol dehydrogenase	+	2,173715252
HDGFL2	Q7Z4V5	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	+	1,572532234
EIF3E	P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	+	2,335919703
LSM4	Q9Y4Z0	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	+	2,347903777
ASMTL	O95671	Probable bifunctional dTTP/UTP pyrophosphatase/methyltransferase protein	+	1,95426816
MEAK7	Q6P9B6	MTOR-associated protein MEAK7	+	1,473932206
CAT	P04040	Catalase	+	2,930386076
ARPP19	P56211	cAMP-regulated phosphoprotein 19	+	2,014930646
BCAP31	P51572	B-cell receptor-associated protein 31	+	2,081910282
SCAMP1	O15126	Secretory carrier-associated membrane protein 1	+	2,52275629
KHDRBS3	O75525	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	+	2,580733695
EXOSC4	Q9NPD3	Exosome complex component RRP41	+	3,073104653
IGLON5	A6NGN9	IgLO family member 5	+	1,806906882
ILKAP	Q9H0C8	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	+	1,908616778
WNK1	Q9H4A3	Serine/threonine-protein kinase WNK1	+	1,79405019
RSRC2	Q7L4I2	Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	+	1,710794518
BLMH	Q13867	Bleomycin hydrolase	+	2,799481151
LSM6	P62312	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	+	2,325034384
SNRPF	P62306	Small nuclear ribonucleoprotein F	+	2,372057597
POLR2A	P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	+	3,204724388
MAD1L1	Q9Y6D9	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	+	1,381220859

RPL15	P61313	60S ribosomal protein L15	+	1,880937082
EXOSC6	Q5RKV6	Exosome complex component MTR3	+	3,265470656
ZC3H11A	O75152	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	+	1,963954466
THOC6	Q86W42	THO complex subunit 6 homolog	+	1,823823832
ACAP2	Q15057	Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	+	1,514425791
UBE2O	Q9C0C9	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme	+	1,919287709
PCM1	Q15154	Pericentriolar material 1 protein	+	3,496399817
SART3	Q15020	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	+	1,633416427
YTHDF2	Q9Y5A9	YTH domain-containing family protein 2	+	1,461063724
MBD3	O95983	Methyl-CpG-binding domain protein 3	+	1,590833808
DENR	O43583	Density-regulated protein	+	1,470111461
SNX27	Q96L92	Sorting nexin-27	+	1,827288021
TRMT1	Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	+	1,633937301
ATP1B3	P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	+	1,367235143
VTI1B	Q9UEU0	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B	+	1,329365504
CD2BP2	O95400	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	+	1,415414688
TAOK1	Q7L7X3	Serine/threonine-protein kinase TA	+	2,281813628
MT-CO2	P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	+	1,879462725
ATP6AP1	Q15904	V-type proton ATPase subunit S1	+	1,780508347
NUFIP2	Q7Z417	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	+	1,679808577
TAF10	Q12962	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	+	2,056963326
CPSF3	Q9UKF6	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	+	1,932628726
NUDCD1	Q96RS6	NudC domain-containing protein 1	+	2,810467909
POLD3	Q15054	DNA polymerase delta subunit 3	+	2,513378763
MLLT11	Q13015	Protein AF1q	+	2,073862274
METAP1	P53582	Methionine aminopeptidase 1	+	1,619574216
PELP1	Q8IZL8	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	+	3,871626366
ZNF579	Q8NAF0	Zinc finger protein 579	+	2,683811373
ACTC1	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1	-	2,844610272
ATP5F1B	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	-	1,635948637
MDH2	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	-	1,498870145
MYH3	P11055	Myosin-3	-	2,939990676
PLEC	Q15149	Plectin	-	1,744032777
ANXA6	P08133	Annexin A6	-	1,513232147
GDI1	P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	-	3,983595904
LMNA	P02545	Prelamin-A/C	-	1,48756809
DES	P17661	Desmin	-	1,867800871
PRDX5	P30044	Peroxisomal oxidase, mitochondrial	-	1,907371126
MYH8	P13535	Myosin-8	-	2,672254554
SLC25A5	P05141	ADP/ATP translocase 2	-	1,418549774
FH	P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	-	2,291142877
PDHB	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	-	3,519164054
TPM1	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	-	2,315515531
MYH1	P12882	Myosin-1	-	2,334112992
TPM2	P07951	Tropomyosin beta chain	-	1,864623441
ARHGDI1	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	-	1,848824899
VCL	P18206	Vinculin	-	1,769174166
AK1	P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	-	1,493925754
PFKM	P08237	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	-	1,640630377
LDHA	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	-	1,502681661
GSN	P06396	Gelsolin	-	1,592705125
LGALS1	P09382	Galectin-1	-	1,716894479
ALDH9A1	P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	-	2,45467851
MMUT	P22033	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial	-	2,27411478
CYCS	P99999	Cytochrome c	-	4,471762599
LAP3	P28838	Cytosol aminopeptidase	-	2,685280235
FTH1	P02794	Ferritin heavy chain	-	1,940426518
MYL1	P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	-	2,57893175
GFAP	P14136	Glial fibrillary acidic protein	-	1,445194801
GET3	O43681	ATPase GET3	-	2,236468411
OAT	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	-	1,744553948
FABP1	P07148	Fatty acid-binding protein, liver	-	2,190277136
MYLPF	Q96A32	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	-	3,518506072
ALDH1B1	P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	-	1,541390113
NDUFV2	P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	-	1,918377414
HEBP2	Q9Y5Z4	Heme-binding protein 2	-	1,75304812
PSAP	P07602	Prosaposin	-	2,215257682
NAXD	Q8IW45	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	-	1,765036516

CKM	P06732	Creatine kinase M-type	-	1,400268791
ACTN2	P35609	Alpha-actinin-2	-	2,392950719
HEXA	P06865	Beta-hexosaminidase subunit alpha	-	3,060310167
MYL4	P12829	Myosin light chain 4	-	2,775881969
ERO1A	Q96HE7	ERO1-like protein alpha	-	1,480811375
ARSB	P15848	Arylsulfatase B	-	1,306144442
GSTA1	P08263	Glutathione S-transferase A1	-	1,850668584
MRPS22	P82650	28S ribosomal protein S22, mitochondrial	-	2,690336803
SYT1	P21579	Synaptotagmin-1	-	1,72585776
TTN	Q8WZ42	Titin	-	2,624849843
KYAT3	Q6YP21	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3	-	1,438498532
RMDN1	Q96DB5	Regulator of microtubule dynamics protein 1	-	1,330855229
RNMT	O43148	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	-	2,941986733
FUCA1	P04066	Tissue alpha-L-fucosidase	-	1,594867804
NDUFS2	O75306	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	-	1,711337791
AGK	Q53H12	Acylglycerol kinase, mitochondrial	-	1,315751975
SERPINF1	P36955	Pigment epithelium-derived factor	-	1,908760285
MIF	P14174	Macrophage migration inhibitory factor	-	1,512148474
PTGR2	Q8N8N7	Prostaglandin reductase 2	-	1,715942838
CRYAB	P02511	Alpha-crystallin B chain	-	2,864530989
APOA4	P06727	Apolipoprotein A-IV	-	1,683802701
GALM	Q96C23	Galactose mutarotase	-	1,557097378
RNASET2	O00584	Ribonuclease T2	-	1,339335413
FABP6	P51161	Gastrotropin	-	2,671146352
PDIA5	Q14554	Protein disulfide-isomerase A5	-	2,27920033
GALC	P54803	Galactocerebrosidase	-	1,591139823
PPP1R21	Q6ZMI0	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 21	-	2,779346549
CMBL	Q96DG6	Carboxymethylenebutenolidase homolog	-	1,321807867
ACADSB	P45954	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	-	1,770254187
GATD1	Q8NB37	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 1	-	2,213552727
AAK1	Q2M2I8	AP2-associated protein kinase 1	-	2,399367972
SNTB1	Q13884	Beta-1-syntrophin	-	1,615816485
NMT1	P30419	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	-	1,826950592
LRBA	P50851	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	-	1,550290718
GCLC	P48506	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	-	2,603133077
RBP2	P50120	Retinol-binding protein 2	-	1,813728546
SEPTIN10	Q9P0V9	Septin-10	-	1,96258614
MANBA	O00462	Beta-mannosidase	-	1,729637103
LARP7	Q4G0J3	La-related protein 7	-	2,851607599
MTHFD1L	Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	-	1,940956276
RWDD1	Q9H446	RWD domain-containing protein 1	-	2,018439468
FN1	P02751	Fibronectin	-	1,522400886
TNNT1	P13805	Troponin T, slow skeletal muscle	-	2,609311362
DCTD	P32321	Deoxycytidylate deaminase	-	2,18556935
PDE6D	O43924	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta	-	1,364780152
TNNI1	P19237	Troponin I, slow skeletal muscle	-	2,269773985
SORCS2	Q96PQ0	VPS10 domain-containing receptor SorCS2	-	1,782439811
PIR	O00625	Pirin	-	1,477996715
TNNT2	P45379	Troponin T, cardiac muscle	-	1,897682834
ACYP2	P14621	Acylphosphatase-2	-	1,960617863
GCA	P28676	Grancalcin	-	1,450053439
AGR2	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	-	2,840724539
ACSL1	P33121	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	-	1,407995718
MTTP	P55157	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit	-	1,591565735
RBM33	Q96EV2	RNA-binding protein 33	-	2,109161522
VPS13C	Q709C8	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	-	1,990179594
CUTC	Q9NTM9	Copper homeostasis protein cutC homolog	-	2,621301542
SACS	Q9NZJ4	Sacsin	-	2,022211023
NPTN	Q9Y639	Neuroplastin	-	2,089232817

Anexo 5: Artigos científicos publicados no período referente ao capítulo 6

Goto-Silva et al. *BMC Developmental Biology* (2019) 19:3
<https://doi.org/10.1186/s12861-019-0183-y>

BMC Developmental Biology

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



Computational fluid dynamic analysis of physical forces playing a role in brain organoid cultures in two different multiplex platforms

Livia Goto-Silva^{1†}, Nadia M. E. Ayad^{1†}, Jasmin L. Herzog², Nilton P. Silva², Bernard Lamien², Helcio R. B. Orlande², Annie da Costa Souza³, Sidarta Ribeiro³, Michele Martins⁴, Gilberto B. Domont⁴, Magno Junqueira⁴, Fernanda Tovar-Moll^{1,5} and Stevens K. Rehen^{1,5*}

Abstract

Background: Organoid cultivation in suspension culture requires agitation at low shear stress to allow for nutrient diffusion, which preserves tissue structure. Multiplex systems for organoid cultivation have been proposed, but whether they meet similar shear stress parameters as the regularly used spinner flask and its correlation with the successful generation of brain organoids has not been determined.

Results: Here we used computational fluid dynamics (CFD) to simulate two multiplex culture conditions: steering plates on an orbital shaker and the use of a previously described bioreactor. The bioreactor had low speed and high shear stress regions that may affect cell aggregate growth, depending on volume, whereas the computed variables of the steering plates were closer to those of the spinning flask.

Conclusion: Our protocol improves the initial steps of the standard brain organoid formation, and the produced organoids displayed regionalized brain structures, including retinal pigmented cells. Overall, we conclude that suspension culture on orbital steering plates is a cost-effective practical alternative to previously described platforms for the cultivation of brain organoids for research and multiplex testing.

Background

Three-dimensional (3D) cerebral organoids generated from human pluripotent stem cells (hPSCs) are complex structures that partly reproduce fetal brain development in vitro, making them powerful tools for the study of human development and disease [1]. The self-organization that occurs during hPSC differentiation in cerebral organoids allows for the appearance of complex structures, including those recapitulating regions of the cerebral cortex, ventral forebrain, midbrain, hindbrain, hippocampus, and retina [2–4]. Several research groups have

used this model to study the development of diseases such as microcephaly, lissencephaly [5, 6], and Zika infection [7], as well as for drug testing [8].

Organoids are grown in 3D suspension culture, which enables efficient nutrient delivery to 3D organized tissue. Historically, cerebral organoids have been cultured in spinner flasks [9]. These flasks have the advantage of providing a low-shear environment [10], which is important because hPSCs have been shown to be sensitive to shear stress [10, 11]. However, spinner flasks have the disadvantage of requiring a high volume of cell culture media for cultivation, increasing the costs of experiments. Thus, they are limited to drug testing and other multiplex experiments including comparison of multiple patients and controls. Recently, Qian et al. (2016) [12] proposed the use of a 3D-printed scalable mini-bioreactor, the SpinΩ, which would be cost effective and

* Correspondence: srehen@lance-ufjf.org

[†]Livia Goto-Silva and Nadia M. E. Ayad are co-first authors.

¹D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rua Diniz Cordeiro, 30 - Botafogo, Rio de Janeiro, RJ 22281-100, Brazil

²Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho 373, Bloco K, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Anexo 5: Artigos científicos publicados no período referente ao capítulo 5

BBA - Proteins and Proteomics 1869 (2021) 140656



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Proteins and Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

Research Paper

Quantitative profiling of axonal guidance proteins during the differentiation of human neurospheres[☆]

Livia Goto-Silva^{a,1}, Michele Martins^{b,1}, Jimmy Rodriguez Murillo^{b,1,2}, Leticia R.Q. Souza^a, Gabriela Vitória^a, Júlia T. Oliveira^a, Juliana M. Nascimento^{a,c}, Erick Correia Loiola^{a,3}, Fabio C. S. Nogueira^b, Gilberto B. Domont^b, Marília Zaluar P. Guimarães^{a,d}, Fernanda Tovar-Moll^a, Stevens Kastrup Rehen^{a,d,*}, Magno Junqueira^{b,*}

^a D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rua Diniz Cordeiro, 30 - Botafogo, Rio de Janeiro, RJ 22281-100, Brazil^b Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Athos da Silveira Ramos, 149 - Bloco A 5º andar - Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil^c Department of Biosciences, Institute Science and Society, Federal University of São Paulo (Unifesp), Rua Silva Jardim, 136, Santos, SP 11015-020, Brazil^d Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rua Manoel Frete Moreira - Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

iTRAQ-based quantitative proteomics
Human induced pluripotent stem cells
Neural stem cells (NSC)
Human neurospheres
Neural differentiation
Axon guidance

ABSTRACT

Axon guidance is required for the establishment of brain circuits. Whether much of the molecular basis of axon guidance is known from animal models, the molecular machinery coordinating axon growth and pathfinding in humans remains to be elucidated. The use of induced pluripotent stem cells (iPSC) from human donors has revolutionized in vitro studies of the human brain. iPSC can be differentiated into neuronal stem cells which can be used to generate neural tissue-like cultures, known as neurospheres, that reproduce, in many aspects, the cell types and molecules present in the brain. Here, we analyzed quantitative changes in the proteome of neurospheres during differentiation. Relative quantification was performed at early time points during differentiation using iTRAQ-based labelling and LC-MS/MS analysis. We identified 6438 proteins, from which 433 were downregulated and 479 were upregulated during differentiation. We show that human neurospheres have a molecular profile that correlates to the fetal brain. During differentiation, upregulated pathways are related to neuronal development and differentiation, cell adhesion, and axonal guidance whereas cell proliferation pathways were downregulated. We developed a functional assay to check for neurite outgrowth in neurospheres and confirmed that neurite outgrowth potential is increased after 10 days of differentiation and is enhanced by increasing cyclic AMP levels. The proteins identified here represent a resource to monitor neurosphere differentiation and coupled to the neurite outgrowth assay can be used to functionally explore neurological disorders using human neurospheres as a model.

Abbreviations: 2D, two-dimensional; 3D, tridimensional; AMPc, cyclic adenosine monophosphate; CAMs, Cell adhesion molecules; CNS, central nervous system; FDR, false discovery rates; GO, Gene ontology; HILIC, hydrophilic interaction chromatography; iPSC, induced pluripotent stem cells; iTRAQ, Isobaric tag for relative and absolute quantitation; MS, mass spectrometry; NSC, neural stem cells; PBS, phosphate-buffered saline; PKA, Protein kinase A.

[☆] "This article is part of a Special Issue entitled: The "Wave" of Brazilian Proteomics edited by Dr. Daniel Martins-de-Souza."

* Corresponding author at: S.K. Rehen, D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rua Diniz Cordeiro, 30 - Botafogo, Rio de Janeiro, RJ 22281-100, Brazil.

** Correspondence to: M. Junqueira, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Athos da Silveira Ramos, 149 - bloco A 5º andar - Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil.

E-mail addresses: srehen@lance-ufjf.org (S.K. Rehen), magnojunqueira@iq.ufjf.br (M. Junqueira).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Division of Chemistry I, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm 14152, Sweden.

³ Present address: Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador- BA, 40296-710, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140656>

Received 20 December 2020; Received in revised form 1 March 2021; Accepted 23 March 2021

Available online 20 April 2021

1570-9639/© 2021 Published by Elsevier B.V.