

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Paloma Farias Dezontini

**SUPEREXPRESSÃO DO MICRORNA-26a COMO ESTRATÉGIA PROMOTORA DE  
CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE NEURITOS *IN VITRO*.**

Belo Horizonte

2024

Paloma Farias Dezontini

**SUPEREXPRESSÃO DO MICRORNA-26a COMO ESTRATÉGIA PROMOTORA DE  
CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE NEURITOS *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr Vinicius de Toledo Ribas

Belo Horizonte

2024

043

Dezontini, Paloma Farias.

Superexpressão do microrna-26a como estratégia promotora de crescimento e regeneração de neuritos in vitro [manuscrito] / Paloma Farias Dezontini. – 2024.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr Vinicius de Toledo Ribas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Sistema Nervoso Central. 3. Terapia Genética. 4. Regeneração Nervosa. 5. MicroRNAs. I. Ribas, Vinicius de Toledo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

### PALOMA FARIAS DEZONTINI

Às **quatorze horas** do dia **26 de agosto de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**SUPEREXPRESSÃO DO MICRORNA-26A COMO ESTRATÉGIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE NEURITOS IN VITRO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Vinicius de Toledo Ribas**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Vinicius de Toledo Ribas	UFMG	APROVADA
Dr. Victor Rodrigues Santos	UFMG	APROVADA
Dr. Walter Luís Garrido Calvacante	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

---

Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em



06/09/2024, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Toledo Ribas, Professor do Magistério Superior**, em 16/09/2024, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Walter Luis Garrido Cavalcante, Professor do Magistério Superior**, em 16/09/2024, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3531109** e o código CRC **C22E2B17**.

---

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a Espiritualidade Maior pelo dom da Vida e pelo amparo dispensado a mim e aos que amo.

Agradeço ao meu orientador o Professor Dr., Vinicius de Toledo Ribas por ter concedido a essa aluna ansiosa e descabelada uma oportunidade de participar do seu seletivo grupo de pesquisa e por estar sempre presente, mesmo quando esteve fora do país. Quero aproveitar e pedir desculpas pelas minhas crises de rebeldia sem causa, mas os “jovens” são rebeldes por natureza (Mas, eu sempre estive certa, viu).

Não poderia deixar de agradecer aos amigos de Ribas Team, pois ninguém faz ciência sozinho, em especial agradeço as amigas do coração, Raquel e Carol: meninas, sem vocês não teria mestrado para defender. Amo vocês.

Agradeço também ao Professor Dr., Victor Rodrigues Santos que mesmo não tendo nenhuma obrigação comigo, foi o coorientador, o psicólogo, o amigo e o fornecedor de chocolate, balas e cafeína. Falando em cafeína, estendo os meus agradecimentos aos seus alunos, pelas nossas sessões de terapia coletiva, sempre regadas a muito café.

Agradeço aos colaboradores desse empreendimento, Clarissa Cyrino pela contribuição com o *scratch*, ao Marco Túlio (“Nanotúlio”), amigo e fornecedor de insumos de laboratório, a Professora Dr<sup>a</sup>., Érika Cristina Jorge pelo MTT e por ter aceito ser minha tutora no estágio didático, agradeço também a suas alunas: Júlia Meireles e Jade Carceroni. Agradeço também ao Professor Dr., Uwe Michel pelos vetores virais e convido o Senhor para vir ao Brasil, nos presentear com um curso sobre vetores virais e para conhecer esse país tropical, abençoado por Deus e bonito por natureza. *ps*: Os custos ficam por conta dos Professores Vinicius e Victor e a tradução simultânea por conta da Carolzinha.

Agradeço a minha querida psicóloga e amiga, Dr<sup>a</sup> Patrícia Tavares Barreto e a minha médica Dr<sup>a</sup> Cyntia Elaine Maia, por não terem me deixado surtar e matar ninguém durante o mestrado. Meu muitíssimo obrigada.

Agradeço também aos meus familiares encarnados e desencarnados, amo todos vocês.

Mãe, sei que a Senhora zela por mim em todos os momentos e me ampara nas minhas dificuldades, te amo. Pai, o Senhor além de ser o meu suporte financeiro também é a minha referência pessoal de caráter, integridade e amor, mesmo que esse amor seja baseado em psicologia reversa, te amo.

Agradeço aos meus irmãos queridos, em particular a minha irmã Livia Souza Dezontini que foi a minha Conselheira, sempre pronta a me ouvir e a me aconselhar nos momentos difíceis, após as rugas com o meu Chefe e por me ajudar com as questões tecnológicas. Livia, mesmo sendo tão jovem seu Espírito é muito sábio. Obrigada por me presentear com a sua maravilhosa comida, comprar chocolate na padaria e aguentar as minhas lamúrias sobre a minha vida financeira e sobre o meu corpo, mesmo tendo uma academia no prédio. Mas, confesso que tenho uma certa preguiça de descer dois andares para ir à academia, pode me julgar.

Mas, deixa eu ter um gatinho aqui no apartamento, deixa vai, por favor!

Agradeço ao meu filho Vinicius Farias Dezontini, amor da minha vida.

Amor, você é a minha Vida, sem Você não teria motivo para viver e muito menos coragem para enfrentar os desafios de uma árdua vida acadêmica. Sou muito grata por você ter me escolhido para ser sua mãe mesmo sendo cheia de defeitos.

Esse mestrado é para você, muito obrigada pelo amor, carinho e companheirismo.

Te Amo, Vi.

Meu muito obrigada a todos que participaram da realização desse sonho e obrigada também as agências de fomento que liberaram a grana para que esse sonho pudesse se tornar realidade e se quiserem bancar o doutorado fiquem à vontade.

Muito Obrigada.

## RESUMO

Danos ao sistema nervoso central (SNC) de mamíferos adultos, sejam eles causados por doenças neurodegenerativas ou por lesões mecânicas traumáticas, resultam em déficits neurológicos irreparáveis aos pacientes, principalmente devido à baixa capacidade regenerativa dos neurônios. Essa incapacidade regenerativa se deve em parte ao ambiente inibitório gerado após as lesões e por fatores intrínsecos aos neurônios, no qual programas de expressão gênica anti-regenerativos são ativados em detrimento da expressão de genes pró-regenerativos. Portanto, estudar moléculas que controlam a expressão gênica, como os microRNAs (miRNA), pode ser importante para o desenvolvimento de novas terapias regenerativas para distúrbios neurodegenerativos, baseadas em terapia gênica. Um interessante miRNA alvo é o miR-26a, que já foi mostrado regular o crescimento de neuritos no SNC e a regeneração axonal no sistema nervoso periférico. No entanto, o papel do miR-26a na regeneração de neurônios do SNC ainda não é muito bem conhecida. Neste trabalho propõe-se a aplicação de terapia genética mediada pela superexpressão do miR-26a conduzida por vetores de vírus adeno-associados (AAV) em neurônios corticais *in vitro*. Para isso, foi desenvolvido um vetor de AAV superexpressando o miR-26a (AAV.miR-26a) e a proteína fluorescente EGFP. Como controle foi desenvolvido um vetor expressando apenas EGFP (AAV.CTRL). Para validar a eficiência da terapia gênica proposta foram usadas culturas primárias de neurônios corticais embrionários de ratos Wistar, através de transdução com vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a. De início, testou-se a eficiência de transdução desses vetores e se apresentariam citotoxicidade aos neurônios, sendo constada uma eficiência de transdução próxima de 90%, sem desencadear citotoxicidade celular diferencial entre eles. Em seguida, realizou-se as análises de crescimento e arborização de neuritos (dendritos e axônios coletivamente), não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas, em ambos os experimentos, entre os neurônios transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a. As próximas análises consistiram em avaliar o potencial do AAV.miR-26a em promover a regeneração de neuritos nos neurônios corticais após lesão do tipo *scratch*, sendo observado um aumento estatisticamente significativo da regeneração neurítica. Por fim, na tentativa de avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o miR-26a promove regeneração de neuritos, foi realizada uma análise de bioinformática para identificar quais seriam os mRNAs alvos do miR-26a. Para tanto, empregou-se a plataforma miRWalk utilizando o algoritmo TargetScan e foi encontrado um total 242 mRNAs alvos para o miR-26a, sendo que 164 não tinham sido validados e 78 já validados. Dentre eles foram encontrados mRNAs de genes envolvidos com regeneração de neuritos. A partir desses resultados fica indicado uma possível utilização do miR-26a como uma estratégia regenerativa promissora de neurônios do SNC. No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar o efeito regenerativos do miR-26a e sua eficiência em terapias gênicas regenerativas para o SNC.

**Palavras-chave:** Sistema nervoso central; terapia gênica; MicroRNA-26a; vetor de vírus adeno-associado; regeneração neurítica.

## ABSTRACT

Damage to the central nervous system (CNS) of adult mammals, whether caused by neurodegenerative diseases or traumatic mechanical injuries, results in irreparable neurological deficits to patients due to the low regenerative capacity of neurons. This regenerative incapacity is due, in part, to the inhibitory environment generated after injuries and by intrinsic factors of neurons, in which anti-regenerative gene expression programs are activated to the detriment of the expression of pro-regenerative genes. Therefore, studying molecules that control gene expression, such as microRNAs (miRNA), may be important for the development of new regenerative therapies for neurodegenerative disorders, based on gene therapy. An interesting miRNA target is miR-26a, which has been shown to regulate neurite outgrowth in the CNS and axonal regeneration in the peripheral nervous system. However, the role of miR-26a in the regeneration of CNS neurons is still not well understood. This work proposes the application of gene therapy mediated by overexpression of miR-26a carried by adeno-associated virus (AAV) vectors in cortical neurons *in vitro*. For this purpose, an AAV vector overexpressing miR-26a (AAV.miR-26a) and the fluorescent protein EGFP was developed. As a control, a vector expressing only EGFP (AAV.CTRL) was developed. To validate the efficiency of the proposed gene therapy primary cortical neurons cultures from embryonic Wistar rats were used, through transduction with AAV.CTRL and AAV.miR-26a viral vectors. Initially, the transduction efficiency of these vectors was tested and whether they would present cytotoxicity to neurons, and was found a transduction efficiency of approximately 90%, without triggering cellular cytotoxicity. Then, analyses of neurite (dendrites and axons collectively) outgrowth and arborization were performed and no statistically significant differences were found in either experiment between neurons transduced with the AAV.CTRL and AAV.miR-26a vectors. The next analyses consisted of evaluating the potential of AAV.miR26a to promote neurite regeneration of cortical neurons after scratch lesion, and was found a statistically significant increase in neurite regeneration. Finally, in an attempt to evaluate the possible mechanisms by which miR-26a promotes neurite regeneration, a bioinformatics analysis was performed to identify which are the mRNA targets of miR-26a. For this purpose, the miRWalk platform was used using the TargetScan algorithm was found a total of 242 mRNA targets of miR26a, of which 164 were not validated and 78 were validated. Among them, mRNAs of genes involved in neurite regeneration were found. These results indicate the possible use of miR-26a as a promising regenerative strategy for CNS neurons. However, additional experiments are needed to confirm the regenerative effect of miR-26a and its efficacy in regenerative gene therapies for the CNS.

Keywords: Central nervous system; gene therapy; MicroRNA-26a; adeno-associated viral vector; neurite regeneration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Curso temporal da degeneração axonal _____	18
Figura 2- Biologia dos vetores de AAV _____	27
Figura 3- Via de Transdução do AAV _____	28
Figura 4- Biogênese dos miRNAs e processos de regulação Traducional _____	32
Figura 5- Mapa dos vetores de AAV _____	36
Figura 6- Lesão do tipo Scratch _____	42
Figura 7- Eficiência de transdução dos vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a _____	45
Figura 8- Efeito do AAV.miR-26a no crescimento de neuritos _____	47
Figura 9- Análise do efeito do AAV.miR-26a na arborização de neuritos _____	49
Figura 10- Análise da regeneração de neuritos após transdução com o AAV.miR-26a____	51
Figura 11- Gráfico representativo das análises de bioinformática _____	52
Quadro 1- Alvos do miR-26a relacionados com neurodegeneração e crescimento/regeneração neuronal _____	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcentagem

µg: Microgramas

µl: Microlitros

µm: Micrometros

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

kb: Kilobases

kDa: Kilodaltons

ml: Mililitros

ml: Mililitros

nm: Nanômetros

°C: Graus Celsius

pb: Pares de base

E18: 18º dia embrionário

AAP: Proteína ativadora de montagem

AAV: Vetor viral adenoassociado

AAV 2/1: AAV recombinante 2/1

AAV- miR-26a: Vetor AAV teste

AAV-CTRL: Vetor AAV controle

AAVS1: Sítio de integração do vírus adeno-associado 1

AGO: Proteína Argonauta

AKT: Proteína Cinase específica de Serina / Treonina

AME: Atrofia muscular espinhal

AP-1: Proteína ativadora 1

B-27: Suplemento de cultura neuronal

BSA: Albumina de soro bovino

CAP: Gene de expressão proteica do Capsídeo dos vírus AAV

CAPI: Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

cDNA: DNA complementar

CEUA-UFMG: Comissão de Ética de Uso de Animais da UFMG

c-JUN: Subunidade celular da família gênica JUN do fator de transcrição AP-1

CMV: Citomegalovírus

CNTF: Fator Neurotrófico Ciliar

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRMP5: Proteína mediadora 5 de resposta à colapsina

CSPGs: Proteoglicanos de Sulfato de condroitina

CTDSPL: Gene que codifica a serina fosfatase de domínio carboxi-terminal pequeno

DIV: Dia *in vitro*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNase: Desoxirribonuclease para clivagem de DNA

dsDNA: DNA fita dupla

EGFP: Proteína fluorescente verde aprimorada (*Enhanced green fluorescent protein*, do Inglês)

EMA: Agência de medicamentos europeia

ER: Retículo endoplasmático

ERK3: Proteína cinase 3 regulada por sinal extracelular

EU: União Europeia

EUA: Estados Unidos da América

EXP5: Exportina 5

FBS: Soro fetal bovino

FDA: *Food and Drug Administration*

GSK-3 $\beta$ : Proteína glicogênio sintase cinase 3-beta

GW -182: Proteína glicina-triptofano, representante da família, das proteínas de 182 kDa

H1: Promotor humano para expressão de pequenos RNA

HEK 293: Células renais embrionárias humanas 293

HMG: Domínio de alta mobilidade de ligação ao DNA

HSPC: Células-tronco hematopoiéticas e progenitoras

hSyn: Promotor humano de sinapsina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

IGF1: Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IGF1R: Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1

IMG: Imagens

ITRs: Repetições terminais invertidas

JAK: Proteína Janus Cinase

JNK3: Proteína c-Jun N-terminal cinase 3

KLF4: Fator de transcrição semelhante a Kruppel 4

KLF7: Fator de transcrição semelhante a Kruppel 7

KLF9: Fator de transcrição semelhante a Kruppel 9

KLFs: Família dos fatores de transcrição semelhantes a Kruppel

LAM: Laminina

LES: Lesão

Let-7: Primeiro miRNA humano descoberto

LIF: Fator inibitório da Leucemia

Lin-4: MicroRNA de *C. elegans*, regulador do desenvolvimento larval.

LPLD: Deficiência familiar de lipoproteínas lipase

MAPK6: Proteína cinase 6 ativada por mitógeno

MAPKs: Proteínas cinases ativadas por mitógeno

miR – 26a-2: MicroRNA-26a locus 2

miR- 26a-1: MicroRNA- 26a locus 1

miR-26b: MicroRNA -26b

miRISC: Complexo de silenciamento induzido por miRNA

miRNA: MicroRNAs

miRNA26a: MicroRNA 26a

MK5: Proteína cinase 5 ativada por MAPK

mRNA: RNA mensageiro

mTOR: Proteína alvo de Rapamicina em mamíferos

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio

NGF: Fator de crescimento nervoso

NPCs: Complexo de poros nucleares

PBS: Tampão fosfato-salino

pCAG: Promotor artificial ubíquo combinado de citomegalovírus,  $\beta$ -actina e globinas de coelho

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFA: Paraformaldeído

PI3K: Fosfoinositídeo 3-Cinase

PIP5K: Enzima fosfolípido cinase fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase

PLO: Poli-L-Ornitina

PN: Progenitores neuronais

PRAK: Proteína cinase ativada/regulada por cinase p38

Pré-miRNA: MicroRNA Precursor

PREP: Preparação

PRG1-5: Família genica dos genes relacionados à plasticidade 1-5

PRG3: Gene 3 relacionado à Plasticidade

Pri-miRNA: MicroRNA Primário

PSN: Solução antibiótica de penicilina, estreptomicina e neomicina

PTEN: Fosfatase e Homólogo de Tensina

p38: Proteína cinase ativada por mitógeno

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

rAAV: Vetor viral adenoassociado recombinante

rAAVs: Vetores virais adenoassociados recombinantes

*REP*: Gene de Replicação dos vírus AAV

Rho GTPases: Proteínas G sinalizadoras pequenas

RhoA: Proteína homóloga Ras A

RNA Pol II: RNA polimerase II

RNA Pol III: RNA polimerase III

RNA: Ácido ribonucleico

RNase III: Ribonucleases III

ROCK 1: Proteína cinase 1 associada a Rho

ROCKs: Família de proteínas cinases associadas a Rho

RPE65: Gene do epitélio pigmentar da retina de 65 kDa

RPM: Rotações por minuto

S6K1: Proteína ribossômica S6 cinase beta 1

SCID-X: Síndrome da imunodeficiência combinada grave ligada ao cromossomo X

SMN: Neurônio motor de sobrevivência humana

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

SOCS3: Gene da proteína supressora de sinalização da citocina 3

SOX5: Fatores de transcrição 5 que contêm um domínio de ligação ao DNA

SOXD: Subgrupo de proteínas SOX, constituído por SOX5, SOX6 e SOX13.

ssDNA: DNA fita simples

STASTs: Proteínas ativadoras de transcrição

STK36: Integrante do complexo proteico de indução de autofagia

TMV: Vírus do Mosaico do Tabaco

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TSC2: Complexo Proteico de esclerose tuberosa 2

Tuj-1: Anticorpo beta-III tubulina específico para neurônios

UB: Ubiquitina

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VP1: Proteínas do capsídeo viral 1

VP2: Proteína do capsídeo viral 2

VP3: Proteína do capsídeo viral 3

WT-AAV: AAV selvagem

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
1.1 Neurodegeneração	16
1.2 Neuroregeneração	19
1.3 Terapia Gênica	23
1.4 Vetores de AAV	25
1.5 MicroRNA	30
1.6 miRNA-26a	33
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>3. OBJETIVOS</b>	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
<b>4. MÉTODOS</b>	36
4.1 Vetores de AAV	36
4.2 Animais	37
4.3 Preparo das placas de cultura celular	37
4.4 Cultura primária de neurônios corticais	38
4.5 Transdução dos neurônios corticais com os vetores de AAV	39
4.6 Viabilidade celular (MTT)	39
4.7 Análise de crescimento de neuritos	40
4.8 Análise de complexidade da arborização dos neuritos (análise de Sholl)	41
4.9 Avaliação da regeneração de neuritos	41
4.10 Imunocitoquímica	42
4.11 Análise de bioinformática	43

4.12 Testes estatísticos _____	43
<b>5. RESULTADOS _____</b>	<b>44</b>
5.1 Vetores de AAV CTRL e AAV.miR-26a transduzem eficientemente neurônios corticais <i>in vitro</i> _____	44
5.2 AAV.miR-26a não altera o crescimento de neuritos de neurônios corticais <i>in vitro</i> _____	46
5.3 AAV.miR-26a não tem efeito na complexidade da arborização de neuritos corticais <i>in vitro</i> _____	48
5.4 AAV.miR-26a aumenta a regeneração de neuritos após lesão do tipo <i>Scratch</i> em neurônios corticais <i>in vitro</i> _____	50
5.5 Resultados análises de bioinformática _____	52
<b>6. DISCUSSÃO _____</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÃO _____</b>	<b>59</b>
<b>8. REFERÊNCIAS _____</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Neurodegeneração

A neurodegeneração é caracterizada pela perda neuronal progressiva em regiões específicas do sistema nervoso, resultando em danos e disfunções neurológicas, em geral, irreversíveis. A neurodegeneração pode ser causada por doenças neurodegenerativas crônicas e por lesões traumáticas que acometem o sistema nervoso, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (KESIDOU *et al.*, 2023; BALASA *et al.*, 2020; PEÑA-BAUTISTA *et al.*, 2020). Os distúrbios neurodegenerativos são muitas vezes progressivos, devastadores e incuráveis, e estão se tornando cada vez mais prevalentes nas populações idosas.

As doenças neurodegenerativas crônicas são patologias que afetam subpopulações de neurônios e tem como características a disfunção neuronal, degeneração axonal e perda neuronal progressiva, resultando no declínio das funções neurológicas, sendo a idade o fator de risco mais proeminente para o desenvolvimento dessas doenças (HOU *et al.*, 2019; KRITSILIS *et al.*, 2018). As doenças neurodegenerativas mais estudadas são as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e a esclerose lateral amiotrófica. A partir de tais estudos, muitos processos celulares têm sido implicados na patologia dessas doenças, incluindo a formação de agregados proteicos, desequilíbrio da autofagia, estresse oxidativo, disfunções mitocondriais, desregulação de cálcio, entre outros (FRICKER *et al.*, 2018; JELLINGER 2001). Embora as manifestações clínicas variem, o resultado é o mesmo: os pacientes ficam incapacitados ao longo de anos e morrem prematuramente (ZANETTI *et al.*, 2009).

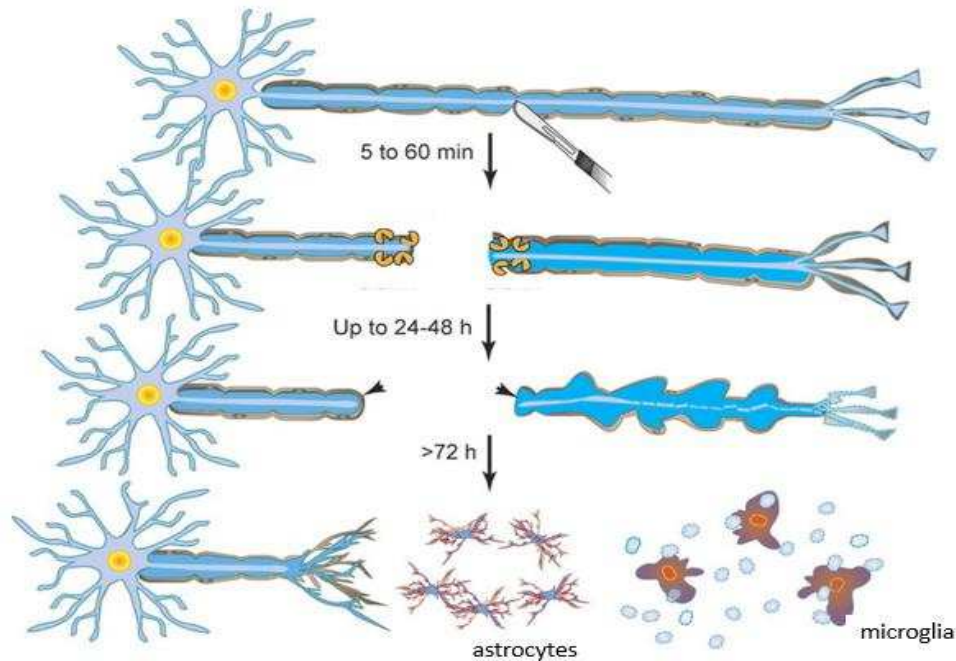
O processo neurodegenerativo, além de ocorrer em doenças crônicas, também pode ocorrer após lesões traumáticas no SNC, onde após um evento mecânico traumático aos neurônios é desencadeada uma série de eventos deletérios no parênquima lesado (AHUJA *et al.*, 2017). Um importante exemplo de neurodegeneração causada por lesão traumática é a lesão medular. Nesta patologia, os neurônios e as células gliais que foram diretamente afetados pelo trauma entram em processo de morte celular, com consequências deletérias à morfologia e função da medula espinhal (AHUJA *et al.*, 2017). Após esse fenômeno primário de morte celular, uma cascata secundária de eventos ocorre ampliando o tecido lesionado, caudalmente e rostralmente. Esses eventos são caracterizados por hemorragia, devido aos insultos acometidos aos vasos sanguíneos, edema, morte celular, excitotoxicidade, peroxidação de lipídios, desmielinização das fibras mielinizadas, ativação de apoptose, cavitação e formação

de cicatriz glial sendo finalizado por um intenso processo inflamatório que pode durar meses. (RAMALHO *et al.*, 2021).

Uma característica comum de distúrbios neurodegenerativos, incluindo as doenças crônicas e as lesões traumáticas, é que os axônios são afetados precocemente (LINGOR *et al.*, 2012). Os axônios são particularmente importantes para as redes neuronais e, juntamente com as sinapses formadas por eles, desempenham um papel central na transmissão de informações. Portanto, danos em axônios do SNC, resultam em déficits neurológicos severos e irreparáveis aos indivíduos (LINGOR *et al.*, 2012). Após um dano axonal, os mesmos entram em um processo de degeneração axonal, um fenômeno no qual os axônios perdem a sua integridade estrutural, não sendo mais capazes de transmitir informações para outras células (COLEMAN & HOKE, 2020).

Um modelo muito utilizado para estudar o processo de degeneração axonal é o de lesões focais em axônios (LINGOR *et al.*, 2012). Durante as primeiras 24 horas após a lesão, os cotos distais e proximais dos axônios passam por um processo autodestrutivo chamado de degeneração axonal aguda, que resulta na fragmentação aguda dos axônios em ambos os lados, com envolvimento do íon cálcio, proteases como as calpaínas e a autofagia (KNÖFERLE *et al.*, 2010; VAHSEN *et al.*, 2020). Após este período inicial de degeneração axonal aguda, o axônio passa por um período de latência (24 a 48 horas após a lesão) no qual a região distal do axônio permanece morfológicamente intacta e eletricamente excitável por um breve período seguido por uma fase de degeneração granular abrupta tardia (após 72 horas da lesão) que resulta em rápida fragmentação de toda porção distal do axônio, chamada de degeneração Walleriana (WANG *et al.*, 2012; ROSELL & NEUKOMM, 2019) (**Figura 1**). Nesta fase a porção proximal do axônio entra em um processo de degeneração retrógrada lenta em direção ao corpo celular, que dependendo do tipo neuronal e do local da lesão pode se estabilizar ou progredir até o corpo celular (COLEMAN & HOKE, 2020).

**Figura 1 - Curso temporal da degeneração axonal.**



Imediatamente após a lesão do axônio (5 a 60 min) até por volta de 24 h, os segmentos axonais proximais (esquerda) e distais (direita) ao local da lesão exibem degeneração aguda de curta distância. Este evento é seguido por uma retração axonal mais lenta e formação de bulbos axonais nos locais da lesão (pontas de seta). Nas próximas 24 a 48 horas após a lesão, há um período de latência relativa, no qual o segmento distal do axônio permanece morfologicamente e eletricamente estável. Após 72 horas da lesão, ocorre rápida fragmentação e degradação completa do segmento distal do axônio através da degeneração Waleriana, seguido por aumento do influxo glial principalmente de micróglia para fagocitar remanescentes axonais (círculos azuis) e astrócitos para formação da cicatriz glial. Adaptado de Wang *et al.*, 2012.

É importante salientar que o processo neurodegenerativo causado, tanto por lesões traumáticas como por doenças neurodegenerativas, até o momento, não possui terapêutica eficaz para retardar, interromper ou prevenir. Assim, informações sobre os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese dessas doenças são fortemente procuradas (AGNELLO & CIACCIO, 2022). Nas doenças neurodegenerativas crônicas e nas lesões traumáticas do SNC embora numerosos sistemas terapêuticos tenham sido testados extensivamente em estudos pré-clínicos, poucos estão atualmente em ensaios clínicos e nenhum foi desenvolvido com sucesso como produtos comerciais (AGNELLO & CIACCIO, 2022; KHADKA *et al.*, 2020),

Considerando que os distúrbios neurodegenerativos representam um problema de saúde pública significativo em todo o mundo, com taxa de incidência crescente e sem tratamento, há

a necessidade urgente de desenvolvimento de novas terapias eficientes. Estas terapias podem ter como objetivo a neuroproteção, no entanto, em situações onde os axônios já foram danificados, também há a necessidade de promoção de neuroregeneração, em particular axonal.

## 1.2 Neuroregeneração

Uma característica comum de processos neurodegenerativos é o dano axonal precoce (LINGOR *et al.*, 2012). No entanto, neurônios do SNC de mamíferos adultos não são capazes de regenerar seus axônios de forma espontânea, após lesões traumáticas ou após doenças neurodegenerativas, resultando muitas vezes, em danos irreversíveis e incapacitantes aos indivíduos. Sendo essa inaptidão regenerativa decorrente de fatores extrínsecos e intrínsecos aos neurônios do SNC de mamíferos adultos. (LINGOR *et al.*, 2012; RIBAS & COSTA, 2017; VARADARAJAN *et al.*, 2022). Abordagens terapêuticas que visem modular esses dois fatores são promissoras na tentativa de promover a regeneração axonal.

O fator extrínseco refere-se ao ambiente da lesão, onde moléculas repressivas de crescimento derivadas de astrócitos e oligodendrócitos, como por exemplo, proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs), glicoproteínas associadas à mielina e Nogo, estão presentes na cicatriz glial ao redor da área lesionada gerando assim um obstáculo físico e bioquímico a regeneração e ao brotamento axonal (UYEDA & MURAMATSU, 2020). Já o fator intrínseco refere-se aos genes expressos pelos próprios neurônios que regulam a regeneração dos axônios tanto negativamente quanto positivamente (RIBAS & COSTA, 2017). Sendo que na última década, os avanços nas análises da expressão gênica neural permitiram a identificação de redes genéticas comprometidas com os processos de reparo dos neurônios do SNC de mamíferos adultos. O reparo dos circuitos neurais requer a modulação de genes envolvidos em uma ampla gama de processos intracelulares (UYEDA & MURAMATSU, 2020). Vários programas transcricionais ativos no desenvolvimento de neurônios são regulados negativamente após o nascimento, e têm a capacidade de influenciar o potencial regenerativo de neurônios maduros do SNC (VARADARAJAN *et al.*, 2022). Recentemente, avanços nas técnicas de sequenciamento genético permitiram que muitos estudos caracterizassem as alterações pós-transcricionais em neurônios do SNC após lesão. Esses estudos identificaram mais de 1.000 genes expressos diferencialmente e descobriu-se novos reguladores da regeneração de axônios

(MAHAR & CAVALLI, 2018). Na tentativa de definir os genes inibidores endógenos da regeneração axonal, os primeiros sucessos centraram-se no gene que expressa a proteína Fosfatase e Homólogo de Tensina (PTEN), sendo originalmente descoberta como uma proteína supressora de tumor. A deleção de PTEN demonstrou aumentar drasticamente a regeneração axonal de neurônios do SNC (FERGUSON & SON, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2018). Dado que PTEN medeia negativamente a via da proteína fosfoinositídeo 3-cinases (PI3K), da proteína cinase específica de serina / treonina (Akt) e da proteína alvo da rapamicina (mTOR) e que a via PI3K/AKT/mTOR desempenha um papel crítico na regulação da formação e extensão de axônios, o aumento da atividade sinalizadora dessa via, pela supressão de PTEN, é capaz de promover o crescimento de axônios (OHTAKE *et al.*, 2015; WILLIAMS *et al.*, 2020). No entanto, a deleção genética do complexo proteico de esclerose tuberosa 2 (TSC2), um inibidor de mTOR, mas não de PI3K, induz uma regeneração axonal mais limitada, sugerindo que, além de mTOR, outras proteínas da via de sinalização a jusante de PI3K, como a proteína ribossômica S6 cinase beta-1 (S6K1) e a proteína glicogênio sintase cinase 3-beta (GSK3 $\beta$ ), sejam importantes para uma regeneração robusta dos axônios. (MIAO *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2014).

Outro gene que também está envolvido na modulação dos processos regenerativos axonais em neurônios de mamíferos adultos é o SOCS3. Esse gene expressa a proteína supressora de sinalização da citocina 3 e sua deleção induz significativa regeneração axonal (SMITH *et al.*, 2009). SOCS3 é um bloqueador intrínseco da regeneração axonal (WILLIAMS *et al.*, 2020; SMITH *et al.*, 2009), por regular negativamente a via das proteínas Janus cinase (JAK) e das proteínas ativadoras de transcrição (STATs). Sendo a via JAK/STAT3 ativada por citocinas, como por exemplo, o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e o fator inibitório da leucemia (LIF), desempenhando um papel crucial na transmissão de sinais extracelulares para o núcleo da célula, interferindo assim na regulação da expressão gênica (MORRIS *et al.*, 2018).

Mais um gene correlacionado com a regeneração de neurônios do SNC é o Gene 3 Relacionado à Plasticidade (PRG3). A família de genes relacionados à plasticidade abrange cinco proteínas transmembranas específicas do cérebro (PRG1-5, também denominadas LPPR1-5) que operam na plasticidade neuronal durante o desenvolvimento, envelhecimento e trauma cerebral (BROGGINI *et al.*, 2016). Especificamente, a expressão da proteína PRG3 induz o crescimento de neuritos *in vitro* e *in vivo*, após lesões encefálicas e medulares. Nas lesões da medula espinhal a proteína PRG3 se acumula nas pontas dos processos neuronais,

principalmente nas pontas finais pré-sinápticas e nos cones de crescimento dos neurônios, atuando sobre as Proteínas G sinalizadoras Pequenas, (Rho GTPases), inibindo a via RhoA-Rock-PIP5K (BROGGINI *et al.*, 2016). Acredita-se que as Rho GTPases mediem a ação de vários inibidores do crescimento axonal no cérebro adulto e na medula espinhal, em específico o membro dessa família proteica, RhoA tem sido um alvo farmacológico em humanos e animais, no intuito de promover o crescimento e a recuperação funcional neurítica após trauma no SNC. A jusante de RhoA, a cinase II associada a Rho (ROCKII) parece ser a chave na ligação aos filamentos de actina e à inibição do crescimento axonal. Existem duas isoformas ROCK, ROCKI onipresente e ROCKII específica do cérebro. Tanto RhoA quanto ROCKII têm sido considerados alvos para promover a regeneração axonal após lesão neuronal. (DUFFI *et al.*, 2009).

Um grupo de proteínas que tem recebido atenção especial no contexto regenerativo axonal, após lesão, são os fatores de transcrição. Com a sua capacidade de se ligar a elementos reguladores do ácido desoxirribonucleico (DNA), tais como promotores e intensificadores, os fatores de transcrição podem influenciar a expressão de grandes conjuntos de genes em uma célula de maneira específica. (MAHAR & CAVALLI, 2018).

Como exemplo desses fatores de transcrição reguladores de regeneração axonal de neurônios do SNC, tem-se a família dos fatores de transcrição semelhante a Kruppel (KLFs), que atuam como efetores positivos e negativos do crescimento do axônio (WILLIAMS *et al.*, 2020; MOORE *et al.*, 2009). O silenciamento dos KLFs supressores de crescimento axonal KLF4 e KLF9, resultou no aumento significativo da regeneração de axônios de neurônios do SNC. (BLACKMORE 2012; APARA *et al.*, 2017). Em APARA *et al.*, (2017), foi demonstrado que KLF9 interage com a proteína JNK3 (c-Jun N-terminal Kinase 3), suprimindo o crescimento dos neuritos no nervo óptico e que a interrupção dessa interação promoveu a regeneração do axônio após lesão do nervo óptico *in vivo*. A proteína JNK3 está envolvida na regulação de muitas atividades celulares, desde a proliferação até a morte celular, sendo expressa no SNC, em nível muito alto, estando envolvida principalmente em processos neurodegenerativos como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, isquemia cerebral e em outros distúrbios do SNC (MUSI *et al.*, 2020).

Em ação contrária ao KLF4 e o KLF9, o membro da família KLF, o fator de transcrição semelhante a Krüppel 7 (KLF7), promove a regeneração de axônios em neurônios adultos do

SNC (HILTON & BRADKE, 2017). O KLF7 é um fator de transcrição que desempenha um papel na especificação do destino celular de linhagens de células neuroectodérmicas e mesodérmicas, regulando marcadores de neurônios e fatores de crescimento como o fator de crescimento nervoso (NGF) que é um fator importante para o crescimento, manutenção e sobrevivência de determinados neurônios e atua também como molécula de sinalização entre os neurônios (WEN-YUAN *et al.*, 2017; CAIAZZO *et al.*, 2010). Além disso, a superexpressão de KLF7 demonstrou a capacidade de promover o brotamento e regeneração de axônios no trato corticoespinhal adulto (WEN-YUAN *et al.*, 2017; CAIAZZO *et al.*, 2010).

Outro fator de transcrição que pode estar envolvido no processo de regeneração axonal de neurônios no SNC é o fator c-Jun. Uma propriedade crucial do c-Jun é a formação de heterodímeros funcionais com múltiplos fatores de transcrição, e estes parceiros podem alterar a afinidade do c-Jun para os locais de ligação ao DNA e, subsequentemente, determinar os genes alvo controlados pelo c-Jun (HERDEGEN *et al.*, 1997). Essa habilidade em formar dímeros de c-Jun oferece um modelo para a capacidade de uma única proteína servir como regulador fundamental de duas respostas neuronais opostas à lesão do axônio e a sua expressão pode estar relacionada tanto à degeneração quanto à sobrevivência neuronal (HERDEGEN *et al.*, 1997). A expressão rápida, seletiva e duradoura de c-Jun em resposta à axotomia ocorre em todo o sistema nervoso periférico (SNP) e no SNC de mamíferos, sendo um componente fundamental bem conservado da resposta neuronal a interrupção do axônio (HERDEGEN *et al.*, 1997). Como componente do complexo AP-1, c-Jun pode dimerizar com outros fatores de transcrição para controlar numerosos genes alvos. Em vários tipos de células, c-Jun demonstrou participar da regulação do ciclo celular, diferenciação, organogênese, transformação tumoral e apoptose, sendo que o destino final dos neurônios após a expressão de c-Jun será em função dos dímeros específicos formados. (HERDEGEN *et al.*, 1997).

Como as terapias atuais para doenças neurodegenerativas, visam alívio sintomático e não abordam a patologia subjacente, à medida que a neurodegeneração progride, a eficácia dos tratamentos farmacológicos é reduzida, porque a barreira hematoencefálica impede que quantidades significativas da maioria dos agentes administrados sistemicamente atinjam o parênquima encefálico em níveis terapêutico sem produzir toxicidade (SUDHAKAR & RICHARDSON, 2018). E para as lesões traumáticas do SNC, embora os avanços médicos tenham melhorado as medidas terapêuticas de suporte para pacientes com lesão traumática, não existem até o momento opções terapêuticas neuroregenerativas eficazes, e o paradigma da

terapia é inevitavelmente direcionado para o controle dos danos, e não para a restauração de um estado de independência funcional (HEJRATIL & FEHLINGS, 2021). Enfrentando um aumento contínuo na prevalência de pacientes com lesões no SNC e doenças neurodegenerativas, terapias neuroprotetoras e neuroregenerativas que possam modular os fatores extrínsecos e/ou intrínsecos têm despertado enorme interesse científico, como por exemplo, através das terapias gênicas.

### 1.3 Terapia Gênica

O conceito de terapia genética surgiu durante a década de 1960 e início da década de 1970, quando os pesquisadores Stanfield Rogers e Peter Pfuderer realizaram a primeira modificação genética no vírus do mosaico do tabaco (TMV). O primeiro sucesso claro foi publicado pelo grupo de Fischer em 2001, descrevendo o tratamento da imunodeficiência combinada grave ligada ao X (SCID-X1) que resulta em baixos níveis de anticorpos (imunoglobulinas) e um número baixo ou ausente de células T (linfócitos), na qual os pacientes foram tratados com células-tronco hematopoiéticas autólogas ou células progenitoras (HSPC) geneticamente modificadas. (ATHANASOPOULOS *et al.*, 2017; ROGERS & PFUDERER, 1968; FISCHER *et al.*, 2001).

A *Food and Drug Administration (FDA)* dos EUA define terapia genética como produtos que medeiam seus efeitos pela transcrição e/ou tradução de material genético transferido (chamado transgene) e/ou pela integração no genoma do hospedeiro e que são administrados como ácidos nucleicos, vírus ou microrganismos geneticamente modificados. Os produtos podem ser usados para modificar células *in vivo* ou transferidas para células *ex vivo*. (WIRTH *et al.*, 2013; TANG & XU, 2020). Comparativamente, a entrega de genes *in vivo* evita os obstáculos práticos de coleta de células, cultura, modificação e transplante em terapia genética baseada em células *ex vivo*, pois consiste na entrega direta de material genético nas células-alvo através de entrega local ou entrega sistêmica. (TANG & XU, 2020)

Geralmente, a terapia genética pode ser categorizada em duas categorias: terapia genética de linhagem germinativa e terapia genética somática. A diferença entre essas duas abordagens é que na terapia genética somática o material genético é inserido em algumas células alvo, mas a alteração não é passada para a próxima geração, enquanto na terapia genética germinativa o gene terapêutico ou modificado será passado para a próxima geração. Esta diferença é

importante, uma vez que a legislação atual permite terapia apenas em células somáticas. (WIRTH *et. al.*, 2013).

A terapia genética tem amplas perspectivas como tratamento eficaz contra a neurodegeneração, causada por doenças neurodegenerativas ou por lesões traumáticas no SNC, alguns tipos de câncer e doenças hereditárias (JICHAO & ROY, 2021; SHAHROR *et. al.*, 2020). No entanto, o DNA e o ácido ribonucleico (RNA), são facilmente degradados *in vivo* devido às suas atividades biológicas como macromoléculas e precisam de um transportador (vetor) eficaz. A seleção do vetor apropriado para entrega permitirá que esses transgenes alcancem seu local de ação e aumentem a eficiência da transdução. Os vetores de transdução atualmente utilizados podem ser divididos em duas categorias principais: vetores virais e não virais. Os vetores virais são uma ferramenta comum na pesquisa de biologia molecular e podem fornecer material genético às células. Os vírus atuais que são utilizados como vetores incluem retrovírus, lentivírus, poxvírus, vírus vaccinia, vírus rubéola, adenovírus e o adenovírus associado (AAV) (JIAO *et. al.*, 2020).

O medicamento Glybera® (também conhecido como alipogene tiparvovec) foi o primeiro produto de terapia genética comercialmente disponível na Europa, foi aprovado para o tratamento da deficiência familiar de lipoproteína lipase (LPLD) no final de 2012. A autorização de comercialização desse medicamento representa claramente um marco no desenvolvimento da terapia genética como uma opção terapêutica acessível para pacientes com LPLD (KAUFMANN *et. al.*, 2013)

A terapia gênica já fornece tratamento para outras doenças como por exemplo, para a atrofia muscular espinhal (AME) e para a amaurose congênita de Leber. (CHENGWEN & SAMULSK, 2020). Para o tratamento da AME está disponível o medicamento ZOLGENSMA®, que consiste em uma terapia genética baseada em vetor de AAV projetado para fornecer uma cópia funcional do gene do neurônio motor de sobrevivência humana (SMN) às células do neurônio motor dos pacientes com AME. Foi desenvolvido pela AveXis, uma empresa da Novartis, e aprovado em maio de 2019 nos EUA para o tratamento de pacientes pediátricos com idade inferior a 2 anos, sendo a primeira terapia genética aprovada para AME na EU. (HOY 2019). Outra terapia gênica disponível na clínica médica é o medicamento LUXTURNA®, para o tratamento da amaurose congênita de Leber. Esse tratamento, obteve autorização de comercialização da FDA no final de 2017 e na EMA (Agência de Medicamentos Europeia) no final de 2018. Esta terapia gênica é baseada em vetor de AAV, destinado a

pacientes com amaurose congênita de Leber, associada a uma mutação bialélica do gene RPE65. Os pacientes recebem uma injeção sub-retiniana bilateral de vetor de AAV contendo o gene terapêutico RPE65 (DUCLOYER *et. al.*, 2020).

Para o sucesso da terapia gênica é fundamental um sistema eficiente de entrega do transgene. Os vírus estão na vanguarda da pesquisa de entrega de elementos genéticos corretivos às células alvo uma vez que evoluíram ao longo de milhões de anos para entregar a sua carga genética às células hospedeiras, e, portanto, podem ser altamente eficientes e versáteis nos mecanismos de entrega de transgenes corretivos (WALTHERS & SEIDLITS, 2015). Dentre os diferentes vetores virais, os vetores de AAV são um sistema promissor para entrega de transgenes no SNC devido ao seu perfil de segurança, bem como à expressão gênica a longo prazo. (STEPANKOVA *et. al.*, 2021).

#### 1.4 Vetores de AAV

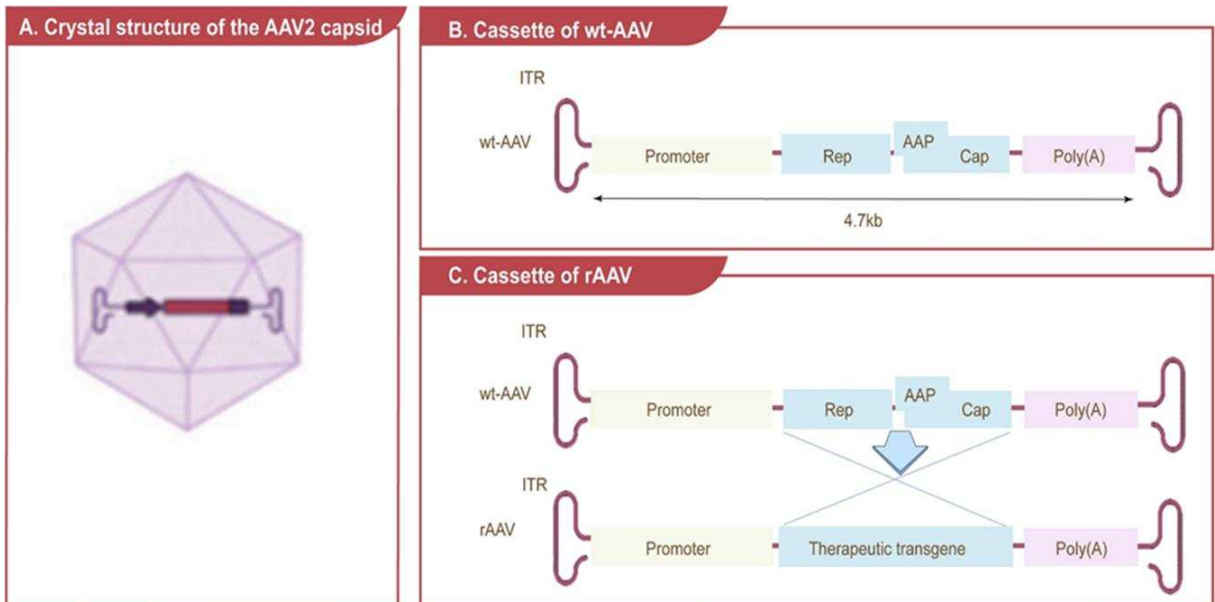
O AAV é um Parvovírus de DNA de fita simples com um genoma de 4.700 nucleotídeos. Como membro da subfamília dos dependovírus, o AAV depende de outro vírus, como o adenovírus ou o vírus herpes simplex, para completar seu ciclo de vida. Na ausência deste vírus auxiliar, o AAV pode estabelecer latência integrando especificamente no local AAVS1 do cromossomo 19 humano. (LI *et. al.*, 2005).

Inúmeras vantagens do AAV tornam-no um veículo ideal para a entrega de genes. Essas características desejáveis incluem sua capacidade de infectar células em divisão e que não se dividem, de transduzir uma ampla gama de tecidos *in vivo*, como cérebro, fígado, músculo, pulmão, retina e músculo cardíaco, e de iniciar a expressão gênica de longo prazo nesses tecidos. Além disso, o AAV de tipo selvagem não causa nenhuma doença conhecida e não estimula uma resposta imunitária mediada por células (LI *et. al.*, 2005).

Uma deficiência significativa dos AAVs é o pequeno tamanho do transgene que pode ser empacotado (<5kb). Isso limita as aplicações para maiores genes e reguladores multipartes mais complexos (CHEN *et. al.*, 2018). Cargas superdimensionadas poderiam ser entregues fragmentando o transgene em capsídeos de AAV separados que são então misturados. Esta estratégia poderia aumentar a capacidade de carga de AAV para tratar doenças monogênicas e poligênicas somente se a coexpressão controlada de múltiplos capsídeos de AAV for alcançada em cada célula transduzida (MATURANA *et. al.*, 2021).

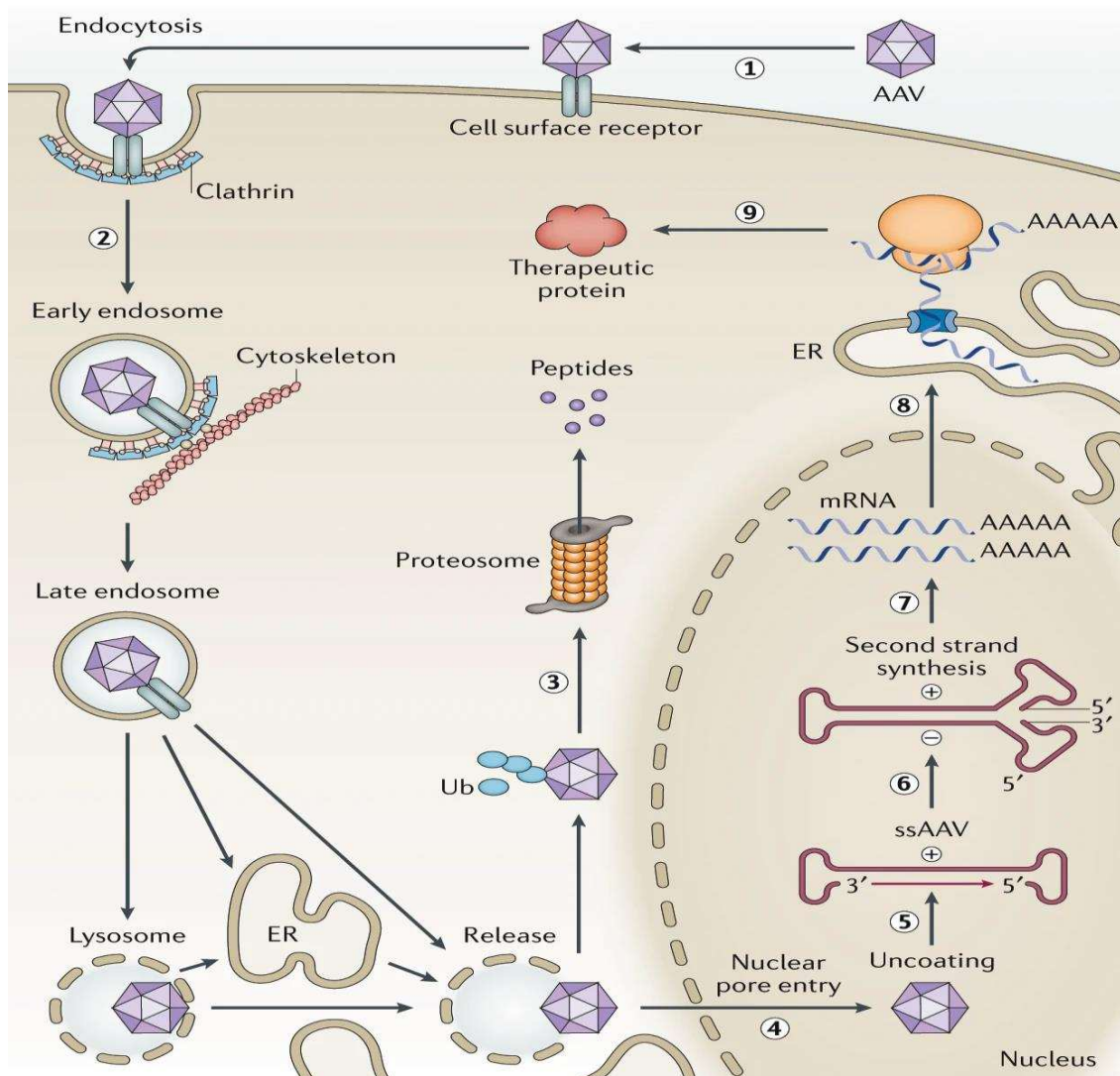
O genoma do AAV selvagem consiste em dois genes, *Cap* e *Rep*, que são flanqueados por repetições terminais invertidas (ITRs). *Rep* codifica proteínas necessárias para a replicação do AAV, enquanto *Cap* codifica as proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 que formam os capsídeos icosaédricos de 20 a 25 nm com proporção proteica de 1:1:10. *Cap* também produz uma proteína não estrutural, a proteína ativadora de montagem, que está envolvida na montagem do capsídeo (HAGGERTY *et. al.*, 2020). Os genomas simples dos AAVs os tornam muito versáteis e ideais para engenharia de vetores. Nas últimas décadas, AAVs recombinantes (rAAVs) foram projetados para ter a maioria dos genomas virais substituídos por cassetes de expressão contendo um promotor, genes de interesse e um terminador, a fim de torná-los mais adequados para aplicações clínicas (AU *et. al.*, 2022) (**Figura 2**).

Os AAVs infectam as células-alvo ligando-se a receptores primários e correceptores na superfície celular, o que desencadeia sua endocitose. Após uma mudança estrutural, as regiões N-terminais das proteínas VP1 e VP2 ficam expostas e os vírus de AAV são liberados dos endossomos podendo ser ubiquitinados e direcionados para degradação mediada por proteassoma ou se acumularem na região perinuclear da célula. Adentrando o núcleo da célula, principalmente através do complexo de poros nucleares (NPCs), os AAV desprendem seus capsídeos e liberam seu genoma de DNA de fita simples (ssDNA), que é então convertido em um molde de DNA de fita dupla (dsDNA) a partir do qual o transgene pode ser transcrito e traduzido. A engenharia de vetores AAV pode alterar qualquer etapa da via de transdução impactando na eficiência de transdução (CHENGWEN *et. al.*, 2020; SAYDE *et. al.*, 2022) (**Figura 3**).

**Figura 2 - Biologia dos vetores de AAV**

**(A)** Estrutura do capsídeo do AAV2 mostrando que o capsídeo é uma estrutura de 20 facetas (icosaédrica), com um diâmetro externo de aproximadamente 25 nm. **(B)** Estrutura do cassete de AAV de tipo selvagem (wt-AAV). O cassete do wt-AAV contém um genoma de DNA de fita simples (aproximadamente 4,7 kb de comprimento) consistindo de poli(A), promotor, gene replicante (Rep), gene estrutural do capsídeo (Cap) e proteína ativadora de montagem (AAP), com ITRs em cada lado do cassete. **(C)** Os vetores de rAAV são gerados pela substituição do genoma viral (Rep, Cap) por um transgene terapêutico e promotor de interesse. Adaptado de Kang *et. al.*, 2023.

**Figura 3 - Via de Transdução do AAV**



Os vetores de AAV se ligam aos receptores e correceptores na superfície das células-alvo (etapa 1) e são levados para dentro das células por endocitose (etapa 2). Após sua liberação dos endossomos, os AAV podem ser ubiquitinados e direcionados para degradação mediada por proteossoma (etapa 3) ou trafegados intracelularmente para o núcleo (etapa 4). Uma vez no núcleo, os vírions de AAV são desempacotados e o genoma do AAV é liberado (etapa 5). O genoma de DNA fita simples do AAV é então convertido em DNA fita dupla (etapa 6), seguido pela transcrição (etapa 7) e a exportação nuclear de mRNA (etapa 8) para a expressão da proteína terapêutica (etapa 9). ER, retículo endoplasmático; ssAAV, AAV fita simples; Ub, ubiquitina. Adaptado de Chengwen *et. al.*, 2020.

Onze sorotipos naturais de AAVs foram identificados até agora, os quais têm diferentes estruturas do capsídeo. Muitos estudos *in vivo* demonstraram claramente que os vários sorotipos de AAV apresentam diferentes tropismos teciduais ou celulares. AAV1 e AAV7 são os sorotipos mais eficientes para a transdução do músculo esquelético. O AAV3 é superior para a transdução de megacariócitos. AAV5 e AAV6 infectam células das vias aéreas apicais de forma eficiente. AAV2, AAV4 e AAV5 transduzem diferentes tipos de células no sistema nervoso central. AAV8 e AAV5 podem transduzir células hepáticas melhor que AAV2. Descobriu-se que o AAV4 transduz a retina de rato de forma mais eficiente, seguido pelo AAV5 e AAV1 (HAGGERTY *et. al.*, 2020 e LI *et. al.*, 2005).

O tropismo dos vetores de rAAV pode ser personalizado no nível do capsídeo e do promotor. O capsídeo dá ao AAV seu tropismo tecidual, ou seja, as células que ele infecta, enquanto o promotor conduz a expressão ubíqua ou tecido-específica do transgene (AU *et. al.*, 2022; LEEUW *et. al.*, 2014). O tropismo dos AAVs pode também ser alterado pela criação de versões recombinantes de múltiplos sorotipos de AAV, um processo conhecido como pseudotipagem. Esses vetores pseudotipados podem ter tropismo aumentado para tipos de células específicas, bem como melhorar a eficiência de transdução em neurônios. Os exemplos mais utilizados são AAV2/5, que aumentam a eficiência de transdução e o tropismo para neurônios combinando partes específicas do capsídeo e genoma de AAV-2 e AAV-5 (HAGGERTY *et. al.*, 2020).

O AAV2 selvagem tem um tropismo natural por neurônios, sendo o sorotipo mais comumente usados em estudos de neurociências. Devido à sua relativa especificidade fenotípica para neurônios e perfil de segurança clínica, o AAV2 recombinante (rAAV2) tem sido o padrão ouro para terapia genética no sistema nervoso, em particular o vetor recombinante AAV2/1, no qual o capsídeo é composto de proteínas derivadas dos capsídeos AAV1 e AAV2. Este vetor mosaico foi projetado para exibir excelência na expressão transgênica (para o vetor AAV1) e altíssima especificidade neuronal (para o vetor AAV2) simultaneamente (HAGGERTY *et. al.*, 2020; SUDHAKAR & RICHARDSON, 2018; KIMURA *et. al.*, 2023).

O reparo dos circuitos neurais por terapia gênica mediada por AAVs requer genes envolvidos em uma ampla gama de mecanismos intracelulares e mudanças contínuas na expressão gênica. Neste sentido, a regulação epigenética tem atraído recentemente muita atenção e é considerada uma estratégia promissora para tratar distúrbios neurodegenerativos.

Uma importante classe de fatores de regulação epigenética são os microRNAs (miRNAs), que tem sido relatado estarem alterados em diferentes distúrbios neurodegenerativos, sugerindo que os miRNAs possam desempenhar papéis importantes nestas patologias (UYEDA & MURAMATSU, 2020).

### 1.5 MicroRNA

Por definição, regulação epigenética é definida como fatores moleculares e processos em torno do DNA que regulam a atividade do genoma independentes da sequência de DNA e são mitoticamente ou meioticamente estável (KIMBEL *et. al.*, 2019). Eventos epigenéticos em organismos eucarióticos evoluíram para fornecer um controle mais preciso e estável da expressão gênica e regulação genômica através de múltiplas gerações. A desregulação de tais processos pode levar a doenças e síndromes enquanto a perda de outros mecanismos de herança epigenética resulta em envelhecimento celular e câncer. Além disso, a capacidade de reprogramar epigeneticamente células diferenciadas está se tornando de importância médica (BERGER *et. al.*, 2009).

Os processos epigenéticos são os mecanismos moleculares que os organismos usam para alterar a expressão genética em resposta às mudanças em seu ambiente. A metilação do DNA foi o primeiro processo epigenético a ser descrito. Após a descoberta da metilação do DNA, também foi descoberto que modificações de histonas nos nucleossomos desempenham um papel na expressão gênica. Modificações de histonas podem influenciar a expressão gênica independente de sequência de DNA. A estrutura da cromatina também pode modificar a expressão genética. Por fim, RNAs não codificantes, como os miRNAs, por exemplo, também desempenham um papel como fator epigenético (KIMBEL *et. al.*, 2019).

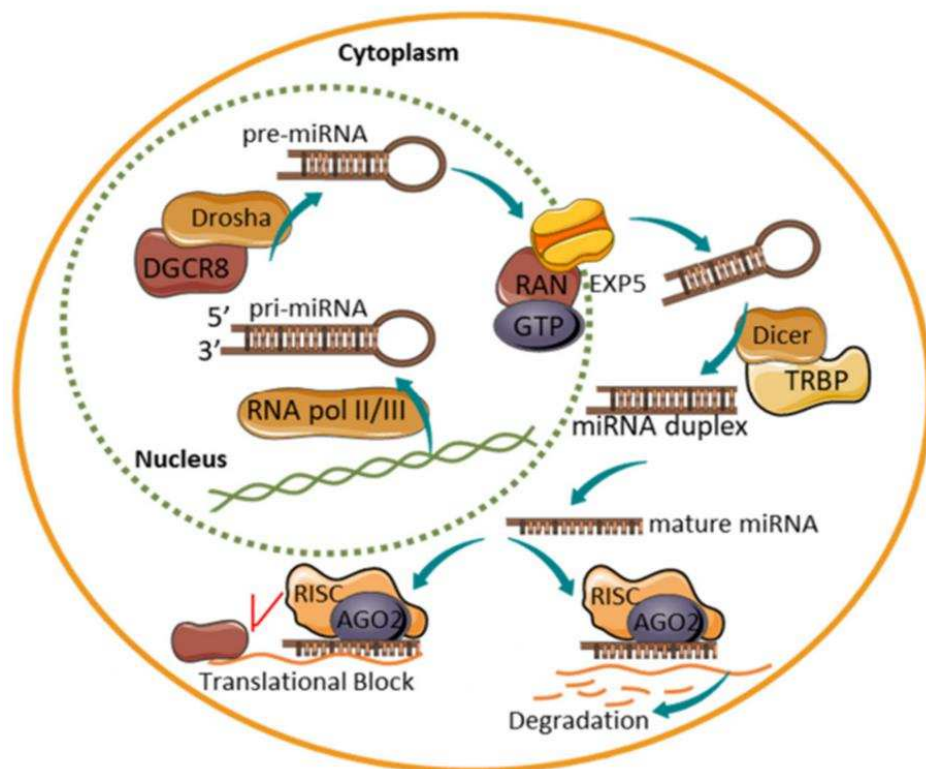
MiRNAs são pequenos RNAs endógenos, com 18 a 25 nucleotídeos, não codificantes para proteínas, que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, através do silenciamento de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Um único miRNA pode regular centenas de mRNAs e influenciar a expressão de muitos genes frequentemente envolvidos em uma mesma via de sinalização celular (LU & ROTHENBERG, 2018). O primeiro miRNA, (lin-4) foi descoberto em *Caenorhabditis elegans* em 1993, e 7 anos depois, let-7 foi identificado. Ambos têm como função regular o tempo de desenvolvimento das larvas de *C. elegans*. O primeiro miRNA humano, o let-7 foi descoberto em 2000 (SALIMINEJAD *et. al.*, 2019).

Normalmente, a biogênese do miRNA é dirigida através de um promotor específico ou como parte de um gene hospedeiro no qual o miRNA é geralmente incluído em regiões intrônicas. Alguns miRNAs estão intimamente localizados no genoma e são transcritos como parte de um transcrito comum (grupo de miRNAs) semelhante a unidades policistrônicas (GARCÍA-LÓPEZ *et. al.*, 2013). Os miRNAs são processados a partir de moléculas precursoras (pri-miRNAs), que são transcritas pela RNA polimerase II, de genes codificadores ou de íntrons de genes codificadores de proteínas. Os pri-miRNAs dobram-se em grampos, que atuam como substratos para dois membros da família de enzimas RNase III, Drosha e Dicer, que são auxiliadas, na maturação do miRNA, por uma série de cofatores ou proteínas acessórias. O produto da clivagem de Drosha, um pré-miRNA de aproximadamente 70 nucleotídeos (pré-miRNAs), é exportado, pelo fator de exportação nuclear, Exportina 5 (EXP5) para o citoplasma onde Dicer o processa em um duplex de miRNA dupla fita com aproximados 20 bp. Uma fita deste duplex é degradada e a outra fita representando um miRNA maduro, é então incorporada no complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). Como parte do miRISC, os miRNAs emparelham bases com os mRNAs e induzem a repressão da tradução ou a degradação do mRNA alvo, através da ativação da proteína Argonauta (AGO), e da proteína glicina-triptofano, representante da família, das proteínas de 182 kDa (GW182), sendo essas duas proteínas, fatores-chave na montagem e função dos complexos miRISCs. O grau de complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo determina se o mRNA será degradado (pareamento completo) ou o processo de tradução será bloqueado (pareamento incompleto) (KROL *et. al.*, 2010; WONG *et. al.*, 2018; XIAOXIAO *et. al.*, 2021) (**Figura 4**).

A capacidade de miRNAs de regular múltiplos mRNAs que são alterados em condições de doença torna essas moléculas interessantes alvos terapêuticos (RUPAIMOOLE & FOLGA, 2017). Descobriu-se que a expressão aberrante de miRNAs está associada a uma variedade de doenças humanas, como câncer/tumores, diabetes, infecções virais, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e outras doenças. Sendo a expressão dos miRNAs específica do tecido, essa expressão pode ser usada na identificação do tipo de tumor e sua origem, no câncer, por exemplo. Muitas investigações sugerem que os perfis de expressão de miRNA podem ser usados como biomarcadores diagnósticos e prognósticos para múltiplas doenças humanas. A manipulação da expressão ou função relevante dos miRNAs pode servir como potenciais estratégias terapêuticas para diferentes doenças (HUANG 2017).

Dentre uma miríade de miRNAs o miR-26a se destaca, por conferir neuroproteção ao SNC (YE *et. al.*, 2021; SU *et. al.*, 2019) e por regular a regeneração axonal SNP (JIANG *et. al.*, 2015), sendo por esses motivos, um forte candidato a ser testado como promotor de regeneração de neurônios do SNC.

**Figura 4 - Biogênese dos miRNAs e processos de regulação Traducional.**



Uma vez transcrito pela RNA Pol II/III, o pri-miRNA se dobra sobre si mesmo para formar uma estrutura em gancho (*hairpin*) que será clivada pela RNase III Drosha e proteínas assessórias, para liberar um pré-miRNA. O pré-miRNA *hairpin* é exportado para o citoplasma através da ação de um complexo proteico liderado pela Exportina 5 (EXP5). No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela RNase III Dicer para produzir um duplex de miRNA maduro de 20 pb. Uma fita do duplex de miRNA, é recrutada para formar o complexo silenciador induzido por miRNA (miRISC). Enquanto a outra fita é degradada. O grau de complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo determina se o mRNA será degradado (pareamento completo) ou o processo de tradução será bloqueado (pareamento incompleto). Adaptado de Wong *et. al.*, 2018.

## 1.6 MiRNA-26a

A família miR-26 humana é um grupo de miRNAs amplamente conservados incluindo miR-26a, miR-26b, miR-1297 e miR-4465, que compartilham a sequência semente (*seed sequence*) idêntica entre vertebrados: "UCAAGUA" (LI *et. al.*, 2021). A expressão dos membros do miR-26 pode ser detectada em muitos tecidos e células normais humanas, como nervos, tecidos musculares lisos arteriais, células imunológicas do sangue total, adipócitos, cólon, neurônios, e também podem ser encontrados em células-tronco embrionárias humanas. (SUH *et. al.*, 2004; LI *et. al.*, 2021). Os membros da família miR-26 estão incorporados nos íntrons dos genes de uma família que codifica pequenas fosfatases do polipeptídeo de RNA polimerase II no domínio carboxi-terminal (CTDSP). Sob condições fisiológicas, a família miR-26 e seus genes hospedeiros são expressos simultaneamente (ICLI *et. al.*, 2014). Análises de dados genômicos indicaram que a forma madura do miR-26a é gerada a partir de 2 loci distintos: miR-26a-1 localizado no íntron do gene CTDSPL no cromossomo humano 3 e miR-26a-2 localizado no íntron do gene CTDSP2 do cromossomo humano 12 (CALIN *et. al.*, 2004; LI *et. al.*, 2021 e ICLI *et. al.*, 2014).

Com relação ao papel do miR-26a no sistema nervoso, já foi demonstrado que o miR-26a é capaz de conferir neuroproteção à neurônios dopaminérgicos da substância negra em um modelo murino da doença de Parkinson, sendo um possível alvo terapêutico para o tratamento desta doença (SU *et. al.*, 2019). O miR-26a também foi capaz de conferir proteção aos neurônios do giro denteado, do hipocampo em modelos animais para anedonia, mimetizando assim o transtorno depressivo em humanos, podendo atuar como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da depressão. (YE *et. al.*, 2021).

Com relação à neuritos e axônios, Li & Sun, (2013) mostraram que a superexpressão do miR-26a em neurônios corticais primários *in vitro* foi capaz de promover crescimento dos neuritos, através da regulação negativa do mRNA de PTEN. No SNP, foi mostrado que o miR-26a é capaz de promover a regeneração axonal em nervos periféricos, através da modulação da expressão de PTEN e GSK-3 $\beta$  (JIANG *et. al.*, 2015). Apesar destes avanços, o papel do miR-26a na regeneração de axônios no SNC ainda não é completamente conhecido, sendo necessário mais estudos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Danos ao SNC de mamíferos adultos, sejam eles causados por doenças neurodegenerativas ou por lesões mecânicas traumáticas, resultam em perdas irreparáveis ao paciente, devido ao processo neurodegenerativo e a falta de regeneração. O baixo potencial de neurônios do SNC em regenerar seus axônios se deve, além dos fatores extrínsecos, de um componente impeditivo que é inerente aos neurônios. Em neurônios do SNC de mamíferos adultos, genes que inibem a regeneração axonal são expressos e genes que promovem a regeneração são reprimidos. Apesar dos avanços nas pesquisas, terem melhorado as medidas terapêuticas de suporte para os pacientes com lesão traumática e doenças neurodegenerativas, não existem até o momento opções terapêuticas neuroregenerativas eficazes para reestabelecer a homeostasia neuronal (RIBAS & COSTA, 2017; VARADARAJAN *et. al.*, 2022 e UYEDA & MURAMATSU, 2020).

Nesse sentido, como as terapias atuais para os distúrbios neurodegenerativos são direcionadas apenas para o controle dos danos, e não para a restauração de um estado de independência funcional ao paciente, terapias que possam promover a regeneração tecidual se fazem necessárias. Nesse contexto, as terapias genéticas se apresentam como ferramentas poderosas para manipulação de genes, por exemplo através da modulação epigenética, com a finalidade de promover uma resposta regenerativa (HEJRATIL & FEHLINGS, 2021; JICHAO & ROY, 2021; SHAHROR *et. al.*, 2020). Dessa forma, a utilização de miRNAs, que são reguladores endógenos da expressão gênica, pode ser uma interessante estratégia terapêutica para os pacientes que apresentam distúrbios neurodegenerativos, que levam a prejuízos imensuráveis para os pacientes e seus familiares. Mais especificamente, a manipulação do miR-26a, que já foi demonstrado ter papéis na neuroproteção e crescimento axonal, pode ser uma estratégia promissora.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Verificar se a superexpressão do miR-26a utilizando vetores de AAV é capaz de promover o crescimento e a regeneração de neuritos de neurônios corticais do SNC em modelo *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

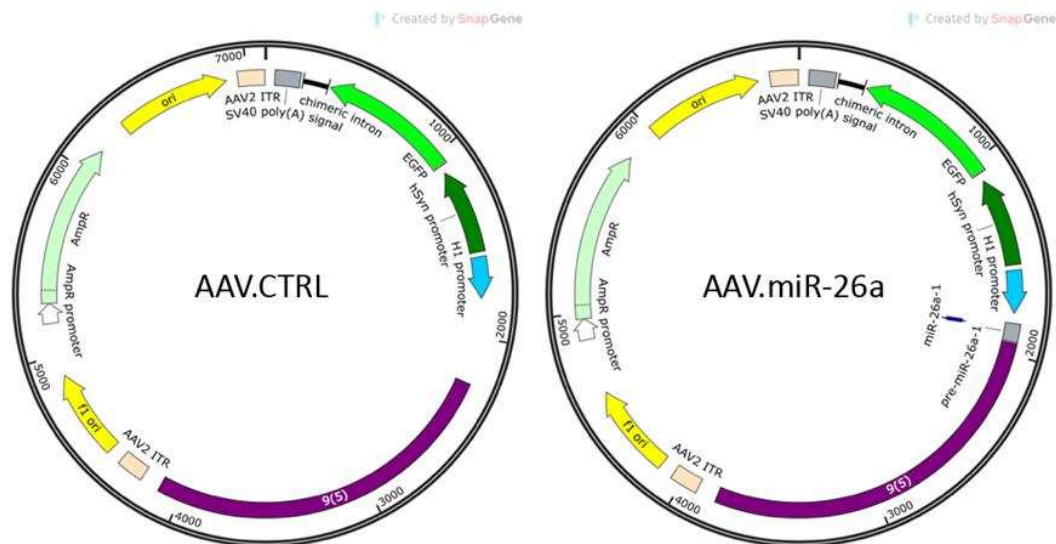
1. Examinar se a superexpressão do miRNA-26a em neurônios corticais primários, utilizando vetores de AAV é capaz de:
  - a) Aumentar o crescimento de neuritos;
  - b) Influenciar a complexidade da arborização neurítica;
  - c) Promover a regeneração de neuritos após uma lesão de *scratch*.
2. Identificar através de análises de bioinformática os prováveis genes alvos do miR-26a e investigar por busca na literatura, seus papéis relacionados ao crescimento e regeneração neuronal.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Vetores de AAV

Os vetores de AAV foram produzidos em parceria com o professor Uwe Michel, da Universidade de Medicina de Göttingen, Alemanha. Nos experimentos, foram utilizados vetores de AAV híbridos baseados nos capsídeos dos sorotipos 1 e 2 (AAV2/1) para a transdução dos neurônios corticais nas culturas primárias. Foram usados vetores de AAV controle (AAV.CTRL), no qual o transgene continha apenas a sequência gênica para a expressão da proteína fluorescente repórter verde EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) sob controle do promotor de Sinapsina humana (hSyn). O vetor para superexpressar o miR-26a (AAV.miR-26a) além das sequências descritas acima, também continha a sequência gênica para a expressão do miR-26a sob controle do promotor H1. Tanto no vetor AAV.CTRL como no AAV.miR-26a suas sequências eram flanqueadas por sequências de repetição terminal invertida (ITR) (**Figura 5**).

**Figura 5 - Mapa dos vetores de AAV**



Vetor AAV.miR-26a (direita) contendo a sequência codificadora para a expressão do miR-26a e a sequência gênica para a expressão da proteína fluorescente repórter verde EGFP, promotores hSyn e H1 e os ITRs. Vetor AAV.CTRL (esquerda) contendo a sequência gênica para a expressão da proteína fluorescente repórter verde EGFP, promotor hSyn e ITRs. Mapas criados pelo programa SnapGene.

Os vetores de AAV foram produzidos por co-transfecção, em células HEK 293 aderentes (*Human embryonic Kidney*), sendo purificadas por ultracentrifugação em gradiente de densidade de Iodixanol, seguido, de cromatografia de troca iônica. Esse método de purificação produz estoque virais com 99% de pureza e com titulação entre  $10^{12}$  e  $10^{13}$  partículas virais por ml. As partículas de AAV foram quantificadas por PCR em tempo real (qPCR).

#### 4.2 Animais

Foram utilizados fetos de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), com 18 dias embrionários (E18). Sendo os animais progenitores fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos em biotério de experimentação, em regime de 12 horas ciclo claro/escuro, temperatura controlada (22-24°C) e com livre acesso a alimento e água. As fêmeas gestantes foram mantidas no biotério de experimentação até o décimo oitavo dia de gestação, contados a partir do cruzamento, quando então foram submetidas a eutanásia, em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), para a coleta dos fetos e realização de cultura celular primária de neurônios corticais. Sendo observadas, para a utilização da câmara de CO<sub>2</sub>, as diretrizes normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), no que diz respeito ao fluxo e o volume do CO<sub>2</sub>, na câmara durante a eutanásia (fluxo de 100% de CO<sub>2</sub> na ordem de 20% do volume da câmara por minuto, sendo esses parâmetros mantidos por dois minutos após a morte clínica). (Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA- Resolução Normativa Nº 37- de 27/01/2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG), sob o número de protocolo 237/2018.

#### 4.3 Preparo das placas de cultura celular

Foram preparados dois tipos de placas de cultura celular, uma de 24 poços e uma de 96 poços, a depender do experimento, na véspera da cultura primária de neurônios corticais. Consistindo esse preparo, nas placas de 24 poços, primeiramente na adição de uma lamínula circular de vidro, previamente flambada com álcool etílico 70%, em cada um dos poços que receberam as células. As placas de 96 poços, utilizadas no teste de Viabilidade Celular (MTT), não receberam lamínulas. Em seguida as placas foram tratadas com Poli-L-Ornitina (PLO; 10 µg/ml) diluído em tampão borato por 4 horas a temperatura ambiente. A PLO consiste em um

aminoácido sintético de carga positiva, utilizado para melhorar a adesão celular a superfície das placas de cultura. Decorridas as 4 horas após a incubação com a PLO, a solução foi removida e os poços foram lavados duas vezes com água ultrapura (água Milli-Q). Após as lavagens, foi adicionado em cada poço uma solução de laminina (LAM), (1 µg/ml) em tampão fosfato-salino (PBS), uma glicoproteína de matriz extracelular, que auxilia na ancoragem dos neurônios a superfície das placas. Os poços foram incubados com a solução de laminina em incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) a 37 graus Celsius (°C), durante uma noite.

No dia da cultura, a preparação das placas foi finalizada, com a retirada da solução de laminina, lavagem de cada poço duas vezes com PBS e acrescentado nas placas meio de cultura de neurônios corticais, constituído de Neurobasal (Gibco), suplementado com B-27, Glutamax, Transferrina e solução antibiótica de penicilina, estreptomicina e neomicina (PSN).

#### 4.4 Cultura primária de neurônios corticais

No décimo oitavo dia após o cruzamento as fêmeas gestantes de ratos Wistar foram eutanasiadas e procedeu-se a coleta dos embriões e imediatamente a dissecação do córtex cerebral para a coleta dos neurônios. Após a dissecação o tecido cortical foi seccionado em pequenos pedaços e adicionado em tubo cônico de 15 ml contendo PBS gelado. Esse tubo falcon contendo os fragmentos corticais foi centrifugado por 4 minutos a 4 °C em 800 rotações por minuto (RPM). Em seguida o PBS sobrenadante foi desprezado e o tecido residual no tubo falcon, foi ressuscitado em 1 ml de enzima tripsina, para promover a dissociação das células do tecido. O tubo cônico foi posteriormente incubado em banho-maria a 37°C durante 15 minutos, sofrendo agitação suave a cada 5 minutos. Após a incubação com tripsina, adicionou-se ao tubo cônico, 50µl de enzima DNase (1-5 mg/ml), para a remoção de eventuais grumos de ácido desoxirribonucleico (DNA) que possam ter se formado, sendo esse DNA oriundo da lise de células mortas. Em seguida essa solução contendo o tecido cortical é novamente centrifugada, agora por 2 minutos a 4°C em 800 RPM para a retirada da tripsina, que foi previamente inativada com 1ml de soro fetal bovino (FBS).

Posteriormente procedeu-se a dissociação mecânica dos neurônios corticais, com o auxílio de pipeta Pasteur de vidro, com o diâmetro da ponta diminuído, pela utilização de calor, previamente preparada para essa finalidade, até que não fossem mais observados pedaços de tecido. A solução contendo as células foi novamente centrifugada por 1 minuto a 4°C em 800

RPM, o sobrenadante foi desprezado e o material depositado no fundo do tubo cônico foi ressuspenso com 3 ml de meio de cultura de neurônios corticais, descrito acima. Uma alíquota das células foi corada com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer por microscopia óptica em objetiva com aumento de 10 vezes.

#### 4.5 Transdução dos neurônios corticais com os vetores de AAV

No intuito, de avaliar se os vetores de AAV seriam eficientes em transduzir os neurônios corticais em cultura, realizou-se o teste de eficiência de transdução. Nesse teste os neurônios corticais foram plaqueados em uma densidade de 250.000 células por poço em placas de 24 poços e 4 horas após foram transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a em diferentes titulações. Os neurônios foram observados durante oito dias por microscopia de contraste de fase, para avaliar a morfologia das células e por microscopia de fluorescência para avaliar a transdução dos neurônios pela expressão de EGFP, em um microscópio de fluorescência Axiovert (Zeiss). Essa análise mostrou que o melhor título viral foi de  $2.10^7$  partículas virais por poço para o vetor AAV.CTRL e  $1.10^7$  para o vetor AAV.miR-26a. Portanto, em todos os experimentos em placas de 24 poços foram usadas essas titulações virais. Nas placas de 96 poços a titulação foi corrigida pela área do poço e número de célula sendo de  $7.10^6$  partículas virais por poço para o vetor AAV.CTRL e  $1.10^7$  para o vetor AAV.miR-26a. Com esses títulos virais foi possível atingir em torno de 90% de taxa de transdução dos neurônios.

#### 4.6 Viabilidade Celular (MTT)

Esse teste foi realizado em parceria com a Prof. Dra. Érika Cristina Jorge e a pós-doutoranda Júlia Meireles, integrantes do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG). O teste de viabilidade celular (ensaio de MTT), desenvolvido por Tim Mosmann *et. al.*, (1983), é uma análise colorimétrica utilizada para detecção de citotoxicidade de agentes químicos, sendo quantificado o dano induzido por um agente no metabolismo celular de glicídios, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do composto MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) que é um sal de tetrazólio amarelo a formazan composto de cor arroxeada, pela atividade das enzimas desidrogenases. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à

viabilidade celular (MAGALHÃES *et. al.*, 2018; RISS *et. al.*, 2016). Esse ensaio foi realizado em placas de 96 poços com densidade de neurônios corticais de 40.000 células por poço. Após 4 horas de plaqueamento os neurônios foram transduzidos com os vetores AAV.miR-26a e AAV.CTRL. Após 7 dias o meio de cultura celular das placas foi retirado e substituído por 100 µl em cada poço da solução, previamente preparada contendo meio de cultura celular novo e o reagente MTT (1:10). Em seguida as placas foram incubadas por 2 horas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% em 37° C. Decorrida essas 2 horas, a solução contendo o MTT foi retirada e a placa foi lavada uma vez com PBS. Logo após, adicionou-se 100 µl de isopropanol ácido para ressuspender os cristais de Formazan. O conteúdo de cada poço foi transferido, em triplicada com um volume total de 30µl cada, para uma nova placa de 96 poços e realizadas as quantificações. Em três poços dessa nova placa foi adicionado somente 30 µl do isopropanol ácido e em outros nove poços foram adicionados 30 µl de meio de cultura dos neurônios corticais como controle negativo, por se tratar de um teste colorimétrico. As placas foram lidas usando espectrofotômetro para placas de multipoços, com medidas de absorvância entre 500-600 nanômetros, e quanto mais escura a solução da placa, maior o número de células viáveis e metabolicamente ativas, sendo a viabilidade celular calculada com base nos dados de absorvância obtidos na leitura.

#### 4.7 Análise de crescimento de Neuritos

Para avaliar o efeito do AAV.miR-26a no crescimento de neuritos, os neurônios foram plaqueados em placa de 24 poços com densidade de 60.000 células por poço. Após 4 horas os neurônios foram transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a e após 8 dias as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% diluído em PBS e foi realizada a imunocitoquímica com o anticorpo contra βIII-tubulina (Tuj1) para marcar os prolongamentos neuronais. Fotomicrografias foram realizadas no CAPI-UFMG, através do microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) com objetiva de 20x. As imagens foram analisadas com o software ImageJ, onde foi calculada a porcentagem da área da imagem ocupada pela marcação de Tuj 1. Para evitar viés, o valor encontrado foi normalizado pelo número de células presentes na imagem.

#### 4.8 Análises de complexidade da arborização dos neuritos (análise de Sholl)

No intuito de analisar o efeito do AAV.miR-26a na arborização dos neuritos foi utilizada a análise de Sholl. Nessa análise os neurônios foram plaqueados em placas de 24 poços com densidade celular de 20.000 células por poço para se obter neurônios isolados. Após 4 horas os neurônios foram transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a e após 8 dias as células foram fixadas com PFA 4% em PBS e foi realizada a imunocitoquímica com o anticorpo contra  $\beta$ III-tubulina (Tuj1) para marcar os prolongamentos neuronais. Então, imagens foram feitas em um microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) com objetiva de 40x.

As imagens foram analisadas no software ImageJ com plug-in para a análise de Sholl. Esse método analítico foi desenvolvido por Donald Sholl em 1953 (SHOLL 1953), sendo na atualidade, amplamente utilizado para demonstrar alterações na estrutura neuronal causada por manipulações genéticas (BIRD & HERMANN, 2019). Esse método consiste em traçar marcações circulares concêntricas a partir do corpo celular dos neurônios, com intervalos de 5  $\mu$ m entre os círculos, sendo avaliado as intercessões entre os neuritos e os círculos concêntricos, iniciando a 5  $\mu$ m do centro do corpo celular do neurônio até 80  $\mu$ m. Dessa forma foi possível avaliar a complexidade da arborização dos neuritos

#### 4.9 Avaliação da regeneração de neuritos

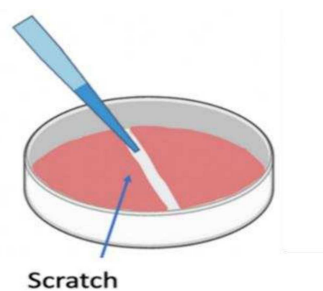
Com o objetivo de avaliar o efeito do AAV.miR-26a na regeneração de neuritos, foi utilizado um modelo de lesão neuronal tipo *Scratch*. Esse experimento foi feito em colaboração com a biomédica Clarissa Ribeiro de Oliveira Cyrino.

Nessa análise os neurônios foram plaqueados em placas de 24 poços com densidade celular de 150.000 células por poço. Após 4 horas os neurônios foram transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a. No sétimo dia após a transdução foi realizada uma lesão do tipo *Scratch* que consiste em uma arranhão latero-lateral perpassando todo o diâmetro dos poços, com o auxílio de uma ponteira de pipeta de 200  $\mu$ l (**Figura 6**). Após 24 horas da lesão os neurônios foram fixados com PFA 4% e as lamínulas dos poços foram montadas imediatamente com em lâminas histológicas com solução de p-fenilenodiamina (PPD - Sigma-Aldrich), evitando assim reações de fotobranqueamento, uma vez que a fluorescência quantificada, foi resultante da expressão do gene repórter EGFP induzida pelos vetores de AAV.

Imagens foram feitas em microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) com objetiva de 20 x e analisadas usando o software ImageJ.

A regeneração dos neuritos foi analisada através de dois tipos de quantificações. Na primeira, o comprimento total dos neuritos foi quantificado na área compreendida entre 100  $\mu\text{m}$  e 200 $\mu\text{m}$  a partir da borda da lesão. Na segunda, o número de neuritos que ultrapassaram a borda de 200 $\mu\text{m}$  foi quantificado. Ambos os dados foram normalizados em relação ao número de neurônios presentes na área 100  $\mu\text{m}$  antes da borda da lesão. Devido à grande variabilidade deste experimento, os dados de cada experimento foram normalizados pelo grupo controle (AAV.CTRL).

### Figura 6 - Lesão do tipo Scratch



Esta lesão consiste em um arranhão latero-lateral passando todo o diâmetro do poço, com o auxílio de uma ponteira de pipeta de 200 $\mu\text{l}$ . Adaptado de Monfared *et. al.*, 2021

#### 4.10 Imunocitoquímica

Os neurônios foram fixados com PFA 4% em PBS por dez minutos e após foram realizadas 2 lavagens com PBS. No primeiro dia da imunocitoquímica, realizou-se a permeabilização das células, com solução PBS-Triton 0,5% em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio com solução de PBS contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA) por 1 hora em temperatura ambiente, com o intuito de evitar ligações inespecíficas dos anticorpos com estruturas neuronais. Decorrido 1 hora, retirou-se a solução de bloqueio e acrescentou-se a mesma solução de bloqueio contendo o anticorpo primário Tuj-1 (1:10.000; BioLegend #801201), sendo esse anticorpo um marcador neuronal, através de sua ligação a  $\beta$ III-tubulina, constituinte dos microtúbulos neuronais. A solução contendo o

anticorpo primário foi incubada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a solução contendo o anticorpo primário foi retirada e cada poço lavado, 2 vezes com PBS gelado, por 5 minutos em temperatura ambiente, sem agitar as placas. Após essas lavagens, foi realizada outra lavagem também com PBS gelado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas, por 1 hora em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (*Donkey anti-Mouse IgG (H+L)*; 1:1000; Thermo Fisher Scientific #A21203). Decorrida 1 hora, o anticorpo secundário foi retirado e as placas foram lavadas 4 vezes com PBS em temperatura ambiente, com agitação orbital de 28 RPM em incubadora *shaker*. Em seguida, após a retirada do PBS da última lavagem, partiu-se para a montagem das lamínulas em lâminas de vidro, próprias para microscopia, utilizando meio de montagem de lâminas Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific #00-4598-02). As lâminas montadas foram acondicionadas em caixas plásticas recobertas por papel alumínio e guardadas em geladeira até o momento de aquisição das imagens em microscópio de fluorescência.

#### 4.11 Análises de Bioinformática

Para as análises de bioinformática foi utilizada a plataforma miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>), no intuito, de identificar os mRNAs alvos preditos e validados do miRNA-26a. Para os alvos preditos, foi considerado um *score* de 0.90 e ligação com a região 3'URT. Para os mRNAs alvos validados, foram considerados apenas os alvos detectados pelo algoritmo TargetScan.

#### 4.12 Testes Estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism (versão 7). Todos os dados experimentais foram agrupados como média + ou – erro padrão da média. Sendo as diferenças entre esses valores médios analisadas pelo teste T não pareado, teste T de uma amostra ou *two-way* ANOVA e pós-teste Tukey de comparações múltiplas. Foi considerado diferença significativa somente quando o valor de P foi inferior a 0,05.

## 5 RESULTADOS

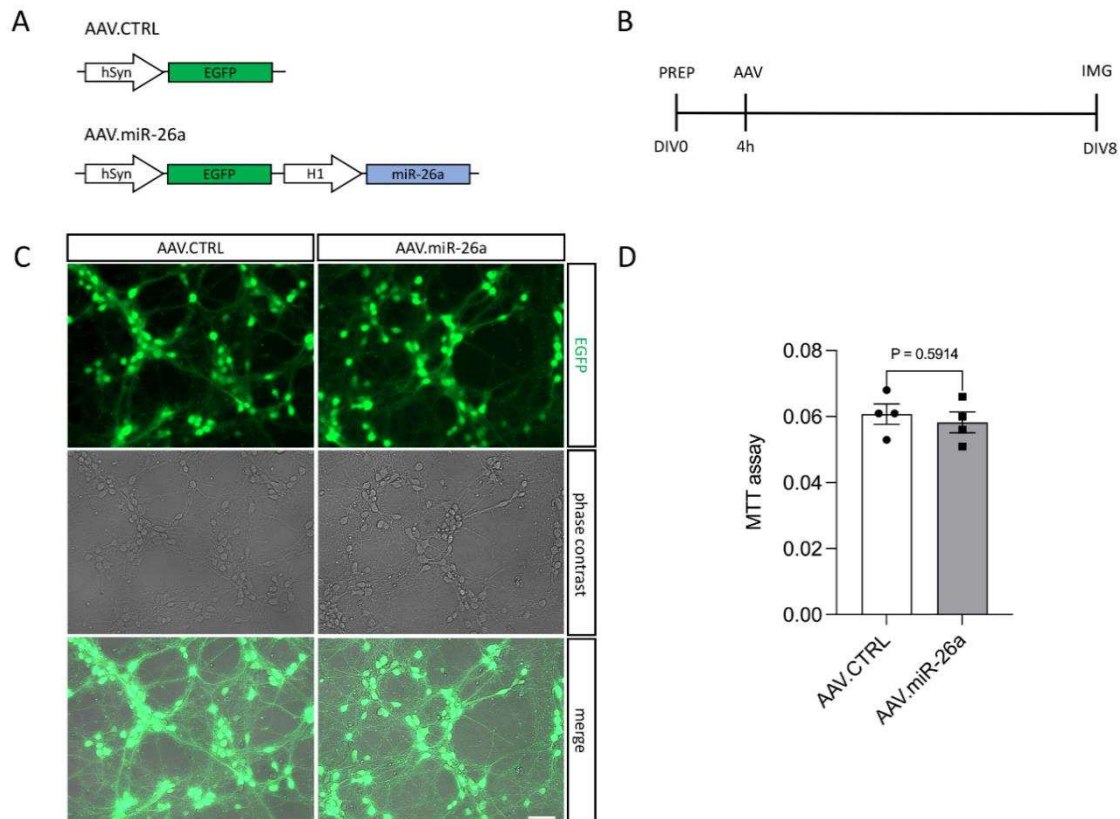
### 5.1 Vetores de AAV CTRL e AAV.miR-26a transduzem eficientemente neurônios corticais *in vitro*.

Com a finalidade de verificar o efeito da superexpressão do miR26a no crescimento e regeneração de neuritos de neurônios corticais *in vitro* foram construídos vetores de AAV em colaboração com o Prof. Uwe Michel da Universidade de Medicina de Göttingen, Alemanha. No vetor de AAV expressando o miR-26a (AAV.miR-26a), sua expressão está sob controle do promotor H1 (**Figura 7A**). Este vetor também expressa o gene que codifica a proteína fluorescente EGFP sob controle do promotor hSyn. Como controle foi construído um vetor de AAV (AAV CTRL) que expressa somente EGFP (**Figura 7A**). Para testar se os vetores de AAV eram capazes de transduzir neurônios corticais em cultura foi realizado um teste de eficiência de transdução. Nesse teste, os neurônios foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços na densidade de 250.000 células por poço. Após 4 horas de plaqueamento, foram adicionados aos poços os vetores controle (AAV CTRL) e o vetor expressando o miR-26a (AAV.miR26a). Após oito dias, imagens de contraste de fase (para visualizar todas as células) e da fluorescência de EGFP (para visualizar as células transduzidas) foram capturadas em microscópio de fluorescência Axiovert (Zeiss) (**Figura 7B**). Foram testadas diferentes titulações dos vetores (dados não mostrados) e foi visto que nos títulos virais de  $1.10^7$  partículas virais por poço para o vetor AAV CTRL e de  $2.10^7$  partículas virais por poço para o vetor AAV.miR26a aproximadamente 90% das células expressavam EGFP para ambos os vetores (**Figura 7C**).

Com o propósito de testar se o vetor AAV.miR-26a poderia conferir citotoxicidade aos neurônios corticais em cultura a viabilidade celular foi testada pelo ensaio de MTT. Nesse teste os neurônios corticais foram plaqueados em placas de 96 poços com uma densidade de 40.000 células por poço, foram transduzidos com os vetores AAV CTRL e AAV.miR-26a e o ensaio de MTT foi realizado após 7 dias. Foi visto que o vetor AAV.miR26a, não demonstrou ser citotóxico quando comparado com o vetor AAV CTRL, não sendo encontrada diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos (**Figura 7D**).

Estes dados mostram que os vetores AAV CTRL e AAV.miR-26a são capazes de transduzir neurônios corticais *in vitro* de maneira eficiente e que não há citotoxicidade diferencial entre os dois vetores.

**Figura 7 - Eficiência de transdução dos vetores AAV CTRL e AAV.miR-26a**

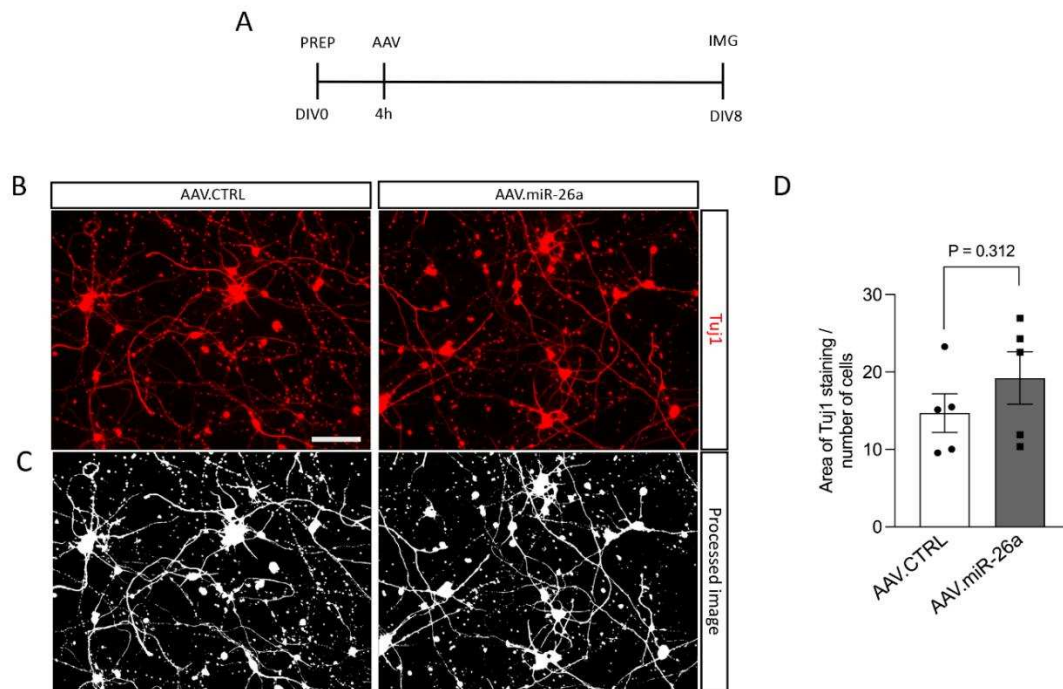


(A) Desenho esquemático dos vetores controle (AAV CTRL), com o transgene contendo a sequência gênica para a expressão da proteína fluorescente repórter verde EGFP sob controle do promotor hSyn (acima) e AAV.miR26a contendo a sequência codificadora para a expressão do miR-26a sob controle do promotor HI e a sequência gênica para a expressão da proteína fluorescente repórter verde EGFP sob controle do promotor hSyn (abaixo). (B) Curso temporal do teste de transdução dos vetores de AAV em cultura de neurônios corticais. PREP: Preparo da cultura neuronal; DIV0: Dia *in vitro* 0; AAV: Transdução com os vetores de AAV 4 horas após plaqueamento; IMG: imagens em microscópio de fluorescência no DIV8. (C) Fotomicrografias representativas mostrando neurônios expressando EGFP (painel superior), em contraste de fase (painel central) e a sobreposição (painel inferior) após transdução com os vetores AAV CTRL (esquerda) e AAV.miR-26a (direita). Barra de escala: 50  $\mu$ m. (D) Gráfico de viabilidade celular através do teste de MTT. No eixo Y, está representada a medida da absorbância e no eixo X estão representados os resultados para os grupos AAV CTRL e AAV.miR-26a. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram analisadas pelo teste T não pareado. N = 4.

## 5.2 AAV.miR-26a não altera o crescimento de neuritos de neurônios corticais *in vitro*.

A identificação e avaliação do crescimento de neuritos é uma leitura importante em numerosos procedimentos experimentais no campo da neurociência (OSSINGER *et. al.*, 2020). Nesse contexto, foi avaliado o efeito do AAV.miR26a no crescimento de neuritos de neurônios corticais *in vitro*. Neste os neurônios foram plaqueados em placas de culturas de 24 poços com uma densidade de 60.000 células por poço. Então, 4 horas após o plaqueamento, os neurônios foram transduzidos com os vetores AAV.CTRL ou AAV.miR26a e 8 dias após as células foram fixadas e foi realizada imunocitoquímica com anticorpo Tuj1 que detecta  $\beta$ III-tubulina, um marcador de microtúbulos neuronais. Fotomicrografias foram obtidas em um microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) (**Figura 8A**). O crescimento neurítico foi contabilizado pelo software ImageJ, onde foi calculado, em porcentagem, a área da imagem ocupada pela marcação de Tuj1, sendo o valor encontrado dividido pelo número de células detectadas na imagem, para normalização dos valores. As imagens mostram que a marcação de Tuj1 é similar nos grupos AAV.CTRL e AAV.miR26a (**Figura 8B, C**). A quantificação mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa na área ocupada pela marcação de Tuj1 comparando os neurônios transduzidos com o vetor AAV.CTRL ( $14,7 \pm 2,5$ ) e o vetor AAV.miR26a ( $19,2 \pm 3,4$ ) ( $P=0,312$ ) (**Figura 8D**). Estes dados sugerem que o vetor AAV.miR26a não foi capaz de influenciar o crescimento dos neuritos de neurônios corticais *in vitro*.

**Figura 8 – Efeito do AAV.miR-26a no crescimento de neuritos**



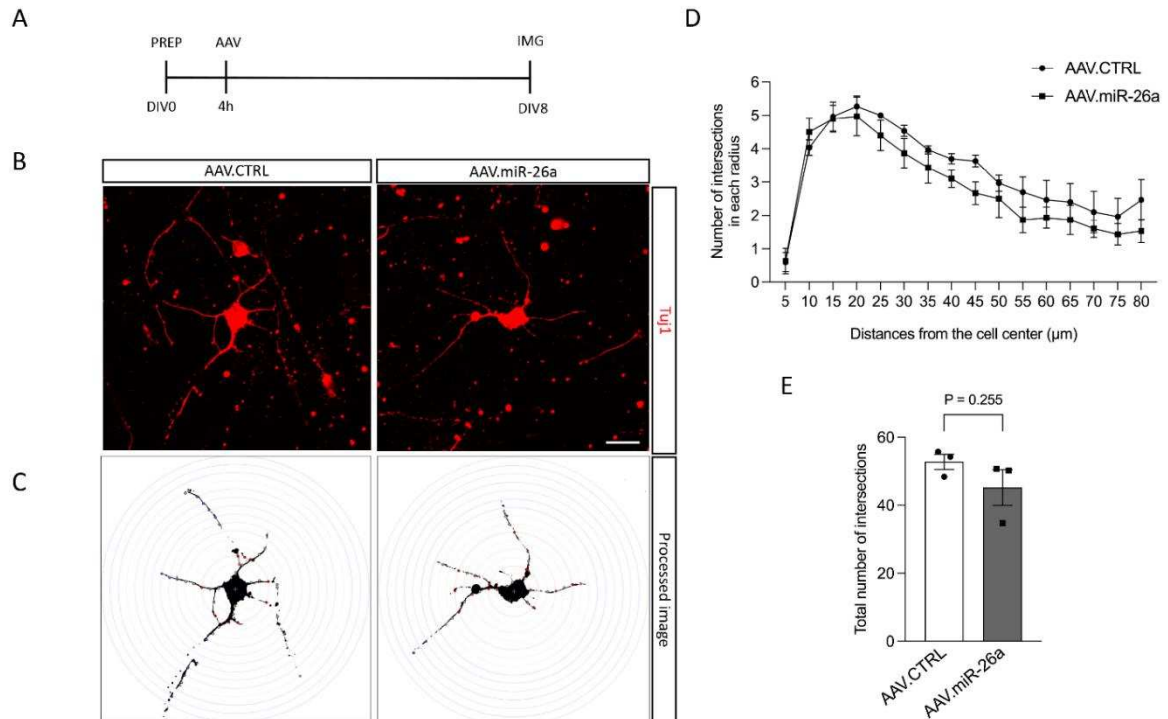
**(A)** Curso temporal do teste de crescimento de neuritos em cultura de neurônios corticais. PREP: Preparo da cultura neuronal; DIV0: Dia *in vitro* 0; AAV: Transdução com os vetores de AAV 4 horas após plaqueamento; IMG: Fixação das células, imunocitoquímica e obtenção das imagens no DIV8. **(B)** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios corticais transduzidos com o vetor AAV CTRL (esquerda) e vetor AAV.miR26a (direita), após imunocitoquímica com anticorpo Tuj-1 (vermelho). Barra de escala: 50  $\mu$ m. **(C)** Mesma imagem mostrada em B, após processamento com o software ImageJ para análise de ocupação de área da marcação de Tuj1. **(D)** Gráfico mostrando a quantificação da área com marcação de Tuj-1 normalizada pelo número de células. No eixo Y está expresso o valor médio da área ocupada pela marcação de Tuj-1 normalizada pelo número de células presentes na fotomicrografia. No eixo X as colunas representativas dos resultados para o AAV CTRL (barra branca) e AAV.miR-26a (barra cinza). Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram analisadas pelo teste T não pareado. N = 5. P = 0,312.

5.3 AAV.miR-26a não tem efeito na complexidade da arborização de neuritos de neurônios corticais *in vitro*.

No intuito de avaliar se o AAV.miR-26a é capaz de alterar a morfologia neurítica e até qual distância do corpo celular poderia atuar, foi realizada a análise de Sholl. Para essa análise, os neurônios foram plaqueados isoladamente em placa de cultura de 24 poços, com uma densidade celular de 20.000 células por poço, transduzidos com os vetores AAV.CTRL ou AAV.miR26a. Então, no oitavo dia após o plaqueamento das células e inoculação dos vetores virais os neurônios foram fixados e uma imunocitoquímica com anticorpo Tuj-1 foi realizada, seguido da obtenção das fotomicrografias de fluorescência através do microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) (**Figura 9A**). Em seguida, utilizou-se o software ImageJ para a realização das marcações e contabilização das interseções entre os neuritos e as marcações circulares concêntricas, para a análise de Sholl.

As imagens de neurônios isolados após marcação de Tuj1 mostra que a arborização dos neuritos é similar nos grupos transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR26a (**Figura 9B**). A quantificação da análise de Sholl mostrou que não há diferenças estatisticamente significativas no número de interseções entre os neuritos e os círculos concêntricos em nenhuma distância analisada comparando os neurônios que foram transduzidos com o vetor AAV.CTRL e o vetor AAV.miR26a (**Figura 9C**). Adicionalmente, foi quantificado o número total de interseções entre os neuritos e os círculos concêntricos e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (AAV.CTRL:  $52,8 \pm 2,2$ ; AAV.miR-26a:  $45,2 \pm 5,3$ ;  $P=0,255$ ) (**Figura 9D**). Estes dados indicam que a transdução com o vetor AAV.miR26a não altera a complexidade da arborização dos neuritos de neurônios corticais *in vitro*.

**Figura 9 - Análise do efeito do AAV.miR-26a na arborização de neuritos**



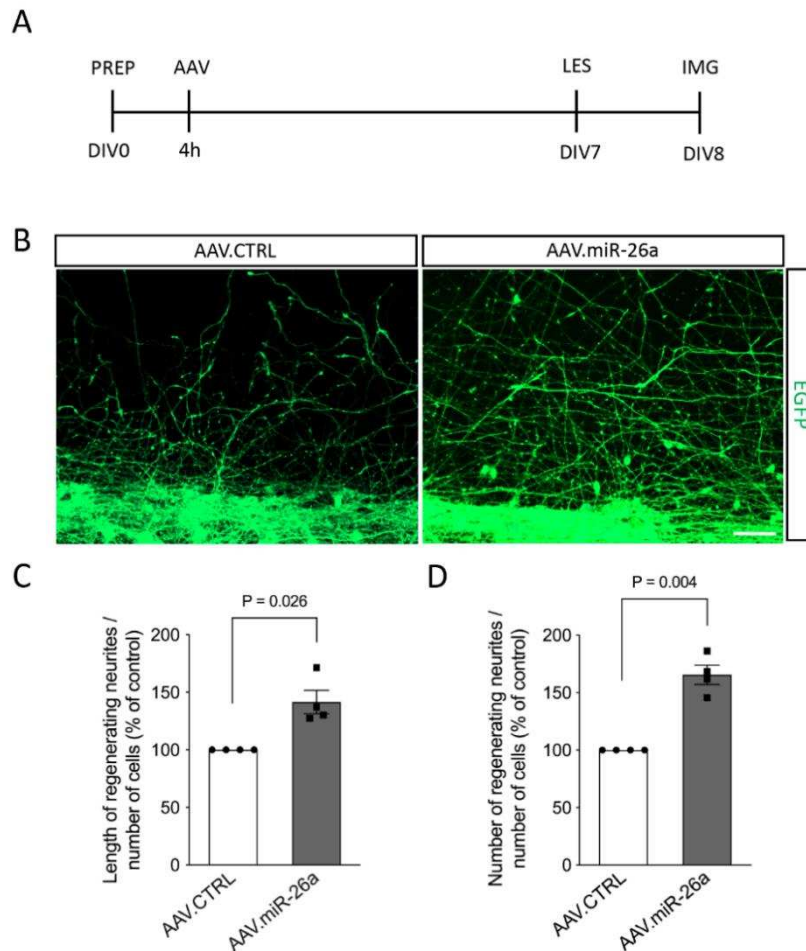
**(A)** Curso temporal do teste de crescimento de neuritos em cultura de neurônios corticais. PREP: Preparo da cultura neuronal; DIV0: Dia *in vitro* 0; AAV: Transdução com os vetores de AAV 4 horas após plaqueamento; IMG: Fixação das células, imunocitoquímica e obtenção das imagens no DIV8. **(B)** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios corticais isolados transduzidos com o vetor AAV CTRL (esquerda) e vetor AAV.miR26a (direita), após imunocitoquímica com anticorpo Tuj-1 (vermelho). Barra de escala: 20  $\mu$ m. **(C)** Mesma imagem mostrada em B, após processamento com o software ImageJ para análise de Sholl. **(D)** Quantificação das interseções entre os neuritos e os círculos concêntricos em cada um dos raios traçados a partir do centro do neurônio. No eixo Y está expresso o número de interseções detectadas e no eixo X cada raio traçado a partir do centro do neurônio pelo método de Sholl. Pontos circulares representam o grupo AAV CTRL e quadrados o grupo AAV.miR-26a. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram analisadas pelo teste two-way ANOVA e o teste de comparação múltipla Tukey. N=3. **(E)** Quantificação do número total de interseções neuríticas. No eixo Y está expresso o número total de interseções detectadas pelo método de Sholl e no eixo X as colunas representativas dos resultados para o AAV CTRL (barra branca) e AAV.miR-26a (barra cinza). Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram analisadas pelo teste T não pareado. N= 3. P=0,255.

#### 5.4 AAV.miR-26a aumenta a regeneração de neuritos após lesão do tipo *scratch* em neurônios corticais *in vitro*.

Tendo visto que o AAV.miR-26a não afeta o crescimento e arborização de neuritos, foi testada agora a capacidade regenerativa do AAV.miR-26a após lesão do tipo *scratch*. Neste modelo, os neurônios corticais foram plaqueados em placas de 24 poços com uma densidade de 150.000 células por poço, transduzidos com os vetores de AAV e após 7 dias foi realizada a lesão. A lesão do tipo *scratch* consiste em um arranhão latero-lateral perpassando todo o diâmetro dos poços da placa de cultura. Após 24 horas as células foram fixadas e as lamínulas forma diretamente montadas em lâminas de vidro seguindo para a aquisição das fotomicrografias em microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) (**Figura 10A**). Os neuritos em regeneração foram identificados pela expressão de EGFP na área da lesão. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ onde foi quantificado o tamanho dos neuritos na área compreendida entre 100  $\mu\text{m}$  e 200  $\mu\text{m}$  a partir da borda da lesão e o número de neuritos que ultrapassaram a distância de 200  $\mu\text{m}$  da borda da lesão. Ambos os dados normalizados pelo número de neurônios presentes na área até 100  $\mu\text{m}$  antes da borda da lesão e, devido a alta variabilidade deste experimento, normalizado também pelo grupo controle (AAV.CTRL).

As imagens da área da lesão mostram uma maior presença neuritos expressando EGFP no grupo AAV.miR-26a comparado com o grupo AAV.CTRL (**Figura 10B**). A quantificação mostrou que a transdução com o AAV.miR-26a aumentou o tamanho dos neuritos na área da lesão em  $41,6\% \pm 10,2$  ( $P=0,026$ ) (**Figura 10C**) e o número de neuritos que cruzaram a linha de 200  $\mu\text{m}$  em  $65,5\% \pm 8,4$  ( $P=0,004$ ) (**Figura 10D**). Estes dados indicam que a transdução com o AAV.miR-26a promove regeneração de neuritos de neurônios corticais *in vitro*.

**Figura 10 – Análise da regeneração de neuritos após transdução com o AAV.miR-26a**

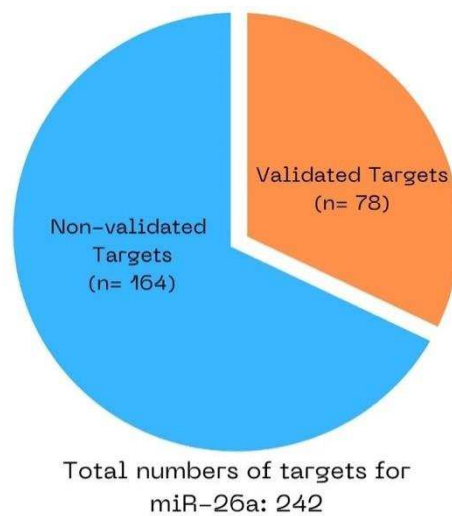


**(A)** Curso temporal do teste de regeneração de neuritos de neurônios corticais *in vitro*. PREP: Preparo da cultura neuronal; DIV0: Dia *in vitro* 0; AAV: Transdução com os vetores de AAV 4 horas após plaqueamento; LES: Lesão do tipo scratch no DIV7; IMG: Fixação das células e obtenção das imagens no DIV8. **(B)** Fotomicrografias representativas mostrando neuritos em regeneração expressando EGFP (verde) na parte superior da imagem e a borda da lesão na parte inferior. **(C-D)** Gráficos mostrando a quantificação do tamanho dos neuritos na área entre 100  $\mu\text{m}$  e 200  $\mu\text{m}$  da lesão **(C)** e do número de neuritos que atingiu a marca de 200  $\mu\text{m}$  da lesão **(D)**. No eixo Y está a medida do comprimento dos neuritos **(C)** e do número de neuritos **(D)**, ambos normalizados pelo controle. No eixo X as barras representativas dos resultados para o AAV CTRL (barra branca) e AAV miR-26a (barra cinza). Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram analisadas pelo teste T de uma amostra. N = 4. P=0,026 **(C)** e P=0,004 **(D)**.

## 5. 5 Resultados Análises de Bioinformática

No intuito de avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o AAV.miR-26a promove regeneração de neuritos foram realizadas análises de bioinformática através da plataforma miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) para identificar os mRNAs alvos preditos e validados do miR-26a. Foi encontrado um total 242 mRNAs alvos para o miR26a, desses genes alvos, 164 não foram validados, resultando em 78 genes alvos validados para o miR-26a (**Figura 11**). Após a detecção dos mRNAs alvos do miR26a realizou-se um levantamento de quais genes estariam diretamente envolvidos em processos de neurodegeneração e crescimento/regeneração de neuritos (**Quadro 1**), sendo encontrados os genes dos mRNA de IGF1, MAPK6, PTEN, ROCK1 e SOX5, que podem ser considerados possíveis alvos do miR-26a em nosso modelo.

**Figura 11 - Gráfico representativo das análises de bioinformática**



Para obtenção dos genes alvos validados para o miR-26a foi utilizada a plataforma MiRWalk sendo encontrado 242 mRNAs alvos, 78 genes validados e 164 genes não validados.

## Quadro 1- Alvos do miR-26a relacionados com neurodegeneração crescimento/regeneração neuronal

Quadro 1. Alvos validados para o miR-26a relacionados com crescimento e regeneração neuronal

Genes	Função	Referências
IGF1	Sobrevivência de neurônios, sinaptogênese, conectividade e plasticidade sináptica; expressão gênica e remodelação do citoesqueleto	Werner [2023] Réthelyi <i>et al.</i> [2023]
MAPK6	Neuroinflamação e neurodegeneração após lesões no SNC	Elkhadragy <i>et al.</i> [2024] Cargnello & Roux [2011]
PTEN	Crescimento e regeneração de neuritos; crescimento e regeneração axonal	Chen <i>et al.</i> [2018] Berry <i>et al.</i> [2015]
ROCK I	Regeneração do citoesqueleto; crescimento e regeneração de neuritos	Yan <i>et al.</i> [2019] Gu <i>et al.</i> [2014]
SOX5	Inibição do crescimento neurítico e da regeneração neurítica	Reescanear & Ralliére [2010] Ikeda <i>et al.</i> [2002] Naudet <i>et al.</i> [2018]

Levantamento realizado através de pesquisa bibliográfica utilizando a base de dados PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho usamos vetores de AAV para avaliar o papel do miR-26a no crescimento e regeneração de neuritos. A primeira etapa desse estudo consistiu em testarmos se os vetores de AAV eram competentes em transduzir os neurônios corticais em culturas primárias e se a transdução com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a poderiam produzir efeitos citotóxicos nesses neurônios. Foi confirmada a eficiência de transdução entre 80% e 90%, para ambos os vetores, através da comparação entre o número de células que expressaram o gene repórter EGFP, presente em ambos os vetores, em microscopia de fluorescência *versus* a contagem dos corpos celulares em microscopia de contraste de fase. Para as análises de citotoxicidade, foi realizado o teste colorimétrico de MTT, não sendo observada toxicidade diferencial entre os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-26a.

Uma vez que os vetores de AAV estavam funcionais e não ofereciam toxicidade aos neurônios em cultura primária, partiu-se para os demais testes. A análise seguinte foi avaliar se a superexpressão do miR-26a seria capaz de aumentar o crescimento neurítico (dendritos e axônios, coletivamente) dos neurônios corticais, em culturas primárias. Como resultado, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas, entre os valores comparando o vetor AAV.CTRL com o AAV.miR26a. Em conjunto, ao teste de crescimento neurítico, foram realizadas análises de Sholl para observação da morfologia neurítica (arborização neurítica). Nas análises de Sholl, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na arborização dos neuritos. A incapacidade de promover o crescimento e mudanças na morfologia dos neuritos em neurônios corticais *in vitro*, observadas nesse estudo são contrários aos resultados obtidos por Li & Sun (2013), onde a regulação positiva do miR-26a, não apenas mudou significativamente, a morfologia, como aumentou o número e o comprimento total médio dos neuritos, pela regulação negativa da proteína supressora de tumor PTEN. Para explicar esse conflito nos resultados, algumas hipóteses, foram levantadas: (i) A diferença da linhagem de ratos utilizada para obtenção dos neurônios corticais e a idade desses neurônios no momento do plaqueamento nas culturas primárias. Nesse projeto foram utilizados neurônios corticais de embriões com 18 dias (E18) de ratos Wistar Hannover, enquanto em Li & Sun. (2013), foram utilizados neurônios corticais de ratos Sprague Dawley neonatos. Uma vez, que as colônias derivadas de ratos Wistar e ratos Sprague-Dawley tenham a sua composição

genética extremamente variável devido aos efeitos fundadores e à deriva genética, é de se esperar que seus neurônios apresentem respostas diferenciadas aos mesmos estímulos experimentais (SUCKOW *et. al.*, 2006). Também deve ser levado em consideração os fornecedores dos animais, bem como o biotério de experimentação onde esses animais são mantidos durante os experimentos, visto que animais de um estoque específico obtidos do mesmo vendedor, mas mantidos em locais diferentes, são susceptíveis de diferir na sua composição genética, também respondendo de forma diferenciada ao mesmo estímulo (SUCKOW *et. al.*, 2006). No que diz respeito a idade dos neurônios corticais plaqueados, em Li & Sun (2013), os neurônios eram mais velhos, oriundos de animais neonatos, enquanto nesse projeto, foram plaqueados neurônios corticais E18, resultando em capacidades de crescimento neurítico diferencial, não sendo possível estabelecer um caráter comparativo entre os neurônios corticais usados nos dois trabalhos (GOLBERG *et. al.*, 2002). (ii) A diferença dos promotores utilizados para a expressão dos transgenes e a forma de inserção desses transgenes nos neurônios corticais *in vitro*. Nos experimentos de Li & Sun (2013), foram utilizados o promotor artificial composto ubíquo pCAG, sendo esse promotor construído pela combinação do intensificador (*enhancer*) de citomegalovírus (CMV), fundido ao promotor da  $\beta$ -actina de galinha (ou esquelética humana), juntamente com a sequências do gene 3-globina de coelho (YEW, 2005; NIWA *et. al.*, 1991). O promotor pCAG é capaz de expressar com alta eficiência genes exógenos transfectados em várias linhagens celulares de mamíferos *in vitro*, e possui uma expressão mais robusta que o promotor de transcrição de pequenos RNAs, H1 (pH1) utilizado em nossos construtos (KOSUGA *et. al.*, 2000; JACKSON *et. al.*, 2016; MÄKINEN *et. al.*, 2006). Outra diferença entre os experimentos que pode contribuir para explicar os resultados de crescimento neurítico contrastantes, refere-se ao modo de transferência do transgene nos neurônios primários. Em Li & Sun (2013), os plasmídeos para a superexpressão do miR-26a foram transfectados por nucleofecção, que consiste em uma forma especializada de eletroporação que permite a introdução do transgene diretamente no núcleo da célula hospedeira, evitando assim as etapas de internalização endossomal mediada por clatrina e de escape endossomal, necessárias a transdução por vetores de AAV. Porém tal como acontece com a eletroporação convencional, a nucleofecção resulta em uma alta taxa de morte celular, além dos altos custos operacionais, sendo por tanto, sua utilização inviável em terapias gênicas (KUMAR *et al.* 2019). Em oposição ao efeito celular deletério da nucleofecção tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a inclusão dos transgenes em neurônios por transdução utilizando vetores de

AAV é bastante segura e eficaz tanto em contextos pré-clínicos e clínicos (NASO *et al.*, 2017). Outra diferença importante no uso de eletroporação *versus* AAV é o tempo de início da expressão do transgene, onde na transdução por AAV esse tempo de início é maior (~ 3 dias) comparado com a eletroporação (~ 24 h). Neste sentido a expressão do miR-26a no nosso modelo poderia estar sendo iniciada em um momento onde os neuritos já estavam crescidos e, portanto, o efeito do miR-26a no crescimento não foi visto. Em conclusão, essas diferenças nos modelos experimentais dos dois trabalhos poderiam explicar os resultados contrastantes.

Uma vez visto que o AAV.miR-26a não teve efeito no crescimento de neuritos, o próximo passo foi avaliar o efeito na regeneração neurítica de neurônios corticais *in vitro*, após lesão do tipo *Scratch*. Nesse experimento foi observado que a transdução com o AAV.miR-26a promoveu um aumento na regeneração neurítica, resultando em um aumento tanto no número de neuritos que ultrapassaram a distância de 200µm da borda da lesão quanto no comprimento dos neuritos na área entre 100µm e 200µm da borda da lesão. Esses resultados, corroboram os resultados obtidos em Gao *et al.*, (2023), no qual a superexpressão do miR-26a, a partir de vesículas responsivas a campos magnéticos, foi capaz de promover a regeneração axonal em neurônios da medula espinhal de ratos após axotomia, tendo por mecanismo a inibição das vias de sinalização de PTEN e GSK-3β.

Uma hipótese para explicar a diferença obtida em nosso trabalho em relação ao crescimento *versus* regeneração de neuritos está no fato do momento em que o miR-26a exerce o seu efeito. Enquanto no modelo de crescimento de neuritos a expressão do miR-26a acontece provavelmente 3 dias após o início do crescimento do neuritos, no modelo de regeneração de neuritos, superexpressão do miR-26a já está presente no momento da lesão, que ocorre no DIV7. Com isso, podemos detectar um efeito biológico da superexpressão do miR-26a no modelo de regeneração de neuritos.

Na tentativa de identificar os genes alvos do miR-26a foi realizada uma análise de bioinformática utilizando a plataforma miRWalk com a aplicação do algoritmo TargetScan com um score de 0.90. Foram encontrados 242 alvos totais, destes 78 alvos validados e 164 alvos não validados para o miR-26a. Dos genes alvos totais encontrados em nossas análises, 5 genes: IGF1, MAPK6, PTEN, ROCK1 e SOX5 se destacam por estarem implicados diretamente em processos neurodegenerativos e regenerativos. No intuito de contextualizar essas relações foi realizada uma breve descrição desses genes com enfoque em suas atuações no SNC.

**IGF1** - O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) é um fator de crescimento proteico constituído de 70 aminoácidos, pertencente a superfamília de hormônios semelhantes à insulina e seu receptor é a proteína de superfície celular IGF1R (WERNER, 2023). IGF1 é um fator neurotrófico essencial para o desenvolvimento adequado do SNC, tendo funções importantes na proliferação e sobrevivência de progenitores neuronais, na diferenciação, sobrevivência e migração neuronal, no desenvolvimento de células gliais, bem como na sinaptogênese, conectividade sináptica e na plasticidade sináptica. Em um nível celular, ele desempenha um papel na regulação do ciclo celular, apoptose, expressão gênica e na remodelação do citoesqueleto e a expressão e/ou sinalização aberrantes de IGF1 contribui na patogênese de transtornos de neurodesenvolvimento e, em certa medida, também para transtornos neuropsiquiátricos (RÉTHELYI *et. al.*; 2023).

**MAPK6** - O gene MAPK6 codifica a proteína cinase ativada por mitógeno 6 (MAPK6), também conhecida como cinase regulada por sinal extracelular 3 (ERK3). As proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) regulam diversos programas celulares ao retransmitir sinais extracelulares para respostas intracelulares. Em mamíferos, há mais de uma dúzia de enzimas MAPK que regulam coordenadamente a proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência celular. Um dos alvos mais conhecidos de ERK3 é a proteína cinase ativada por MAPK, MK5 (também conhecida como proteína cinase ativada/regulada por p38 [PRAK]) (CARGNELLO & ROUX, 2011). Diferentes estudos sugerem que o nível de expressão de ERK3 é regulado positivamente após a indução de lesão por isquemia e contribui para a lesão, possivelmente promovendo inflamação celular, estresse oxidativo e morte celular (ELKHADRAGY *et. al.*, 2024). Portanto, a regulação negativa de MAPK6/ERK3 pelo miR-26a poderia ser uma importante estratégia contra a neuroinflamação e neurodegeneração.

**PTEN** - O gene PTEN codifica a proteína Fosfatase e Homólogo de Tensina (PTEN), que é uma fosfatase dupla com atividades de fosfatase proteica e lipídica. Nos últimos anos, a função de PTEN no crescimento e regeneração axonal em neurônios do SNC tem atraído bastante atenção, uma vez que PTEN atue como um regulador negativo de uma via importante de sinalização de crescimento e sobrevivência celular, nomeadamente a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) /AKT/ alvo de rapamicina de mamífero (mTOR) (CHEN *et. al.*; 2018). Pesquisas recentes sugerem que a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR seja capaz de mediar o crescimento dos axônios do SNC durante o desenvolvimento neuronal e que a supressão da atividade nessa via ocorra durante a maturidade, à medida que os níveis de PTEN aumentem e

inibam a ativação de PI3K e de mTOR, sendo a inibição dessa via por PTEN possivelmente relacionada com a falha da regeneração axonal no SNC de mamíferos adultos. Essa hipótese é apoiada por pesquisas que corroboram que a supressão de PTEN em animais adultos experimentais promova uma regeneração axonal impressionante no SNC (BERRY *et al.*, 2015). Neste sentido, a inibição da expressão de PTEN pelo miR-26a pode ser um dos mecanismos pelos quais o AAV.miR-26a promove regeneração de neuritos em nosso modelo.

**ROCK1** - As cinases associadas a Rho (ROCKs) são proteínas cinases serina-treonina que atuam a jusante de pequenas GTPases Rho para regular a dinâmica do citoesqueleto de actina. Duas isoformas de ROCK (ROCK1 e ROCK2) são expressas no SNC de mamíferos, em humanos, e são reguladores potentes do citoesqueleto de actina, sendo, portanto, cruciais para a formação dos espinhos dendríticos e função sináptica (YAN *et al.*, 2019). Sendo a proteína cinase ROCK1 um regulador potente do citoesqueleto de actina, é um alvo promissor para o tratamento de distúrbios do SNC. Já foi mostrado que a inibição da expressão de ROCK1 promove crescimento de neuritos, enquanto, a sua superexpressão tem o efeito oposto (GU *et al.*, 2014). Portanto, ROCK1 pode ser outro alvo do miR-26a envolvido no efeito de promoção de regeneração de neuritos observado em nosso trabalho.

**SOX5** - Os genes SOX codificam fatores de transcrição que contêm um domínio de ligação ao DNA denominado, domínio de grupo de alta mobilidade (HMG). As proteínas Sox desempenham um papel importante no desenvolvimento dos vertebrados, incluindo a embriogênese inicial, a gastrulação e a indução do desenvolvimento neural e contribuem para a diferenciação em muitas linhagens. Sox 5 pertence ao subgrupo Sox D junto com Sox 6 e Sox 13 e é expresso em muitos tecidos adultos, incluindo o cérebro, rim, pulmão, cartilagem e músculo esquelético (REESCANEAR & RALLIÉRE, 2010; IKEDA *et al.*, 2002). Já foi mostrado que o aumento dos níveis de Sox5 em células neuronais inibe o crescimento de neuritos de forma dependente da proteína mediadora 5 de resposta à colapsina (CRMP5), sugerindo que a via Sox5-CRMP5 é um modulador crítico do crescimento de neuritos (NAUDET *et al.*, 2018). Assim, Sox5 emerge como mais um alvo do miR-26a envolvido no crescimento/regeneração de neuritos.

## 7 CONCLUSÃO

Em resumo, nesse estudo foi observado que a transdução de neurônios corticais com o vetor AAV.miR-26a não teve efeito no crescimento neurítico, contudo a capacidade regenerativa foi aumentada nos neurônios corticais após lesão do tipo *Scratch*. Com esses resultados, fica indicado uma possível utilização do miR-26a como uma estratégia regenerativa promissora de neurônios do SNC. No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar o efeito regenerativos do miR-26a. Estes experimentos podem incluir analisar a análise da regeneração axonal de neurônios plaqueados em câmaras microfluídicas, uma vez que esse dispositivo permite a compartimentalização dos axônios, possibilitando assim especificar em qual dos neuritos (axônios e dendritos coletivamente) se deu o processo regenerativo encontrado nas análises de regeneração neuríticas. Além disso, experimentos em modelos in vivo, como o de lesão do nervo óptico ou lesão medular, também podem ser realizados. Em conclusão, este trabalho identificou o vetor AAV.miR-26a como uma interessante ferramenta para promover regeneração no SNC através de terapia gênica.

## 8 REFERÊNCIAS

- AGNELLO, L.; CIACCIO, M.- **neurodegenerative diseases: From Molecular Basis to Therapy**-Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 12854
- AHUJA, S. C.; WILSON, R. J.; NORI, S.; KOTTER, N.R. M.; DRUSCHEL, C.; CURT, A.; FEHLINGS, G. M.- **Traumatic spinal cord injury**- Nature Reviews/ Disease Primers, (2017). Article Number 17018/ Volume 3
- APARA, A.; GALVÃO, J.; WANG, Y.; BLACKMORE, M.; TRILLO, A.; IWAO, K.; JUNIOR, B. P. D.; FERNANDES, A. K.; HUANG, A.; NGUYEN, T.; ASHOURI, M.; ZHANG, X.; SHAW, X.P.; KUNZEVITZKY, J. N.; MOORE, L. D.; LIBBY, T. R.; GOLDBERG, L. J.- **KLF9 and JNK3 Interact to Suppress Axon Regeneration in the Adult CNS**- The Journal of Neuroscience, 2017: 37(40):9632–9644
- ATHANASOPOULOS, T.; MUNYE, M. M.; YÁNEZ-MUNOZ, J. R.- **Nonintegrating Gene Therapy Vectors**- Hematol Oncol Clin N Am 31 (2017) 753–770
- AU, E. K. H.; ISALAN, M; MIELCAREK, M.- **Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings**- Frontiers in Medicine: (2022); Vol. 8, 809118.
- BALASA, F. A.; CHIRCOU, C.; GRUMEZESCU, M. A.- **Body Fluid Biomarkers for Alzheimer’s Disease—An Up-To-Date Overview**-Biomedicines 2020, 8, 421; 1-21.
- BERGER, L. S.; KOUZARIDES, T.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A.- **An operational definition of epigenetics**- GENES & DEVELOPMENT (2009); 23:781–783.
- BERRY, M.; AHMED, Z.; MORGAN-WARREN, P.; FULTON, D.; LOGAN, A.- **Prospects for mTOR-mediated functional repair after central nervous system trauma**- Neurobiol Dis. (2016), 85:99-110
- BIRD, D. A.; HERMANN, C. **Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components**. Cell Reports 27, 3081-3096, (2019).
- BLACKMORE, G. M.- **Molecular Control of Axon Growth: Insights from Comparative Gene Profiling and High** - International Review of Neurobiology, (2012); Vol 105: 39-70
- BLACKMORE, G. M.; WANG, Z.; LERCH, K. J.; MOTTI, D.; ZHANG, P. Y.; SHIELDS, B. C.; LEE, K. J.; GOLDBERG, L. J.; LEMMON, P. V.; BIXBY, L. J.- **Krüppel-like Factor 7 engineered for transcriptional activation promotes axon regeneration in the adult corticospinal tract**- PNAS, (2011), Vol. 109, N°. 19: 7517–7522
- BROGGINI, T.; SCHNELL, L.; GHOOCHANI, A.; MATEOS, M.J.; BUCHFELDER, M.; WIENDIECK, K.; SCHÄFER, K. M.; EYPLOGU, Y. I.; SAVASKAN, E. N.- **Plasticity Related Gene 3 (PRG3) overcomes myelin-associated growth inhibition and promotes functional recovery after spinal cord injury**- Aging 2016, Vol. 8, No. 10
- CAIAZZO, M.; COLUCCI-D’AMATO, L.; ESPOSITO, T. M.; PARISI, S.; STEFANI, S.; RAMIREZ, F.; PORZIO, D. C.- **Transcription factor KLF7 regulates differentiation of neuroectodermal and mesodermal cell lineages**- Experimental Cell Research 316 (2020) 2365-2376

CALIN, A. G.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, D.C.; HYSLOP, T.; NOCH, E.; YENDOMURI, S.; SHIMIZU, N.; RATTAN, S.; BULLRICH, F.; NEGRINI, M.; CROCE, M. C.- **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers**-PNAS, 2004 vol. 101 no. 9 2999–3004

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P.- **Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases**- Microbiology and Molecular Biology Reviews, (2011): 50-83

CHEN, Y. H., KEISER, M. S., & DAVIDSON, B. L.- **Viral vectors for gene transfer**- Current Protocols in Mouse Biology, (2018).

CHEN, Y-C.; CHEN, J.; HE, L.; STILES, L. B.- **PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator**- Front. Endocrinol., (2019), Sec. Cancer Endocrinology, Vol. 9: 1-12

CHENGWEN, L.; SAMULSK, J.- **Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy**- Nature Reviews/ Genetics- Vol. 12, (2020) -255-272

COLEMAN, P. M.; HOKE, A.- **Programmed axon degeneration: from mouse to mechanism to medicine**- Nature Reviews/Neuroscience (2020), Vol. 21; 183-196

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa, Nº 37: *Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA*- Brasília, 27 de janeiro de 2018.

DUCLOYER, BJ.; MEUR, L. G.; CRONIN, T.; ADJALI, O.; WEBER, M.- **La thérapie génique des rétinites pigmentaires héréditaires**- médecine/sciences 2020; 36: 607-15

DUFFI, P.; SCHMANDKE, A.; ANTONIO, S.; SIGWORTH, J.; NARUMIYA, S.; CAFFERTY, J.B.W.; STRITTMATTER, M. S.- **Rho-Associated Kinase II (ROCKII) Limits Axonal Growth after Trauma within the Adult Mouse Spinal Cord**- Journal of Neuroscience, (2009), 29(48):15266 –15276

ELKHADRAGY, L.; MYERS, A.; LONG, W.- **Role of the Atypical MAPK ERK3 in Cancer Growth and Progression**- Cancers 2024, 16, 1381

FERGUSON, T. A.; SON, Y-J.- **Extrinsic and intrinsic determinants of nerve regeneration**- Journal of Tissue Engineering 2(1) -(2011)

FISHER, A.; HACEIN-BEY, S.; LE DESIST, F.; SAINT BASILE, D. G.; CAVAZZANA-CALVO- **Gene Therapy for Human Severe Combined Immunodeficiencies**- Immunity, 2001, Vol. 15, 1–4

FRICKER, M.; TOLKOVSKY, M. A.; BORUTAITE, V.; COLEMAN, M.; BROWN, C.- **Neuronal Cell Death**- Physiol Rev 2018 1;98(2):813-880.

GAO, X.; LI, S.; YANG, Y.; YANG, S.; YU, B.; ZHU, Z.; MA, T.; ZHENG, Y.; WEI, B.; HAO, Y.; WU, H.; ZHANG, Y.; GUO, L.; GAO, X.; WEI, Y.; XUE, B.; LI, J.; FENG, X.; LU, L.; XIA, B.; HUANG, J.- **A Novel Magnetic Responsive miR-26a@SPIONs-OECs for Spinal Cord Injury: Triggering Neural Regeneration Program and Orienting Axon Guidance in Inhibitory Astrocytic Environment**- Adv. Sci. 2023, 10, 2304487

GARCÍA-LÓPEZ, J.; BRIEÑO-ENRÍQUEZ, A.M.; MAZO, D.J.-**MicroRNA biogenesis and variability.**- *BioMol Concepts* 2013; 4(4): 367–380

GOLDBERG, L. J.; KLASSEN, P. M.; HUA, Y.; BARRES, A. B.- **Amacrine-Signaled Loss of Intrinsic Axon Growth Ability by Retinal Ganglion Cells**- *Science* (2002) Vol. 296: 1860-1863

GU, X.; MENG, S.; LIU, S.; JIA, C.; FANG, Y.; LI, S.; FU, C.; SONG, Q.; LIN, L.; WANG, X.- **miR-124 Represses ROCK1 Expression to Promote Neurite Elongation Through Activation of the PI3K/Akt Signal Pathway**- *J Mol Neurosci* (2014) 52:156–165

HAGGERTY, L. D.; GRECCO, C. G.; REEVES, C. K.; ATWOOD, B.- **Adeno-Associated Viral Vectors in Neuroscience Research**- *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* Vol. 17 June 2020, 69-82.

HEJRATIL, N.; FEHLINGS, G. M.- **A review of emerging neuroprotective and neuroregenerative therapies in traumatic spinal cord injury**-*Current Opinion in Pharmacology* 2021, 60:331–340

HERDEGEN, T.; SKENE, P.; BÄHR, M.- **The c-Jun transcription factor – bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration**- *Trends Neurosci.* (1997) 20, 227–231

HILTON, J. B.; BRADKE, F.- **Can injured adult CNS axons regenerate by recapitulating development?** - *The Company of Biologists Development* (2017) 144, 3417-3429

HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y.; HASSELBALCH, G. S.; CROTEAU, L. D.; BOHR, V.- **Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease**- *Nature Reviews Neurology* (2019), vol. 15, 565–581

HOY, M. S. - **Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval**- *Drugs* (2019) 79:1255–1262

HUANG, W.- **MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics**-*Bioinformatics in MicroRNA Research, Methods in Molecular Biology*, vol. 1617, 57-67.

ICLI, B.; DORBALA, P.; FEINBERG, W. M.- **An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular Disease**- *Trends in Cardiovascular Medicine*- Vol. 24: 2014, 241-248

IKEDA, T.; ZHANG, J.; CHANO, T.; MABUCHI, A.; FUKUDA, A.; KAWAGUCHI, H.; NAKAMURA, K.; IKEGAWA, S.- **Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene**- *Gene*, (2002), Vol.298: 59-68

JACKSON, L. K.; DAYTON, D. R.; DEVERMAN, E. B.; KLEIN, L. R.- **Better Targeting, Better Efficiency for Wide-Scale Neuronal Transduction with the Synapsin Promoter and AAV-PHP.B**- *Front. Mol. Neurosci.* Vol. 9:116.

JELLINGER, A. K.- **Cell death mechanisms in neurodegeneration**- *J.Cell.Mol.Med.* Vol 5, N° 1, 2001 pp. 1-17

JIANG, J.J.; LIU, C.M.; ZHANG, B. Y.; WANG, X. W.; SAIJILAFU; ZHANG, S. R.; HALL, P.; HU, Y. W.; ZHOU, F. Q.- **MicroRNA-26a supports mammalian axon regeneration in vivo by suppressing GSK3 $\beta$  expression.** - Cell Death and Disease (2015).

JIAO, Y.; LIXIA, Z; ZÉ, J.L.; JING, H.; XIN, B.; FU, S.- **Research Progress of nucleic acid delivery vectors for gene therapy-** Biomed Microdevices 22, 16 (2020)

JICHAO, S.; ROY, S. - **Gene-based therapies for neurodegenerative diseases-**Nature Neuroscience | VOL 24 | March 2021 | 297–311

KANG, L.; JIN, S.; WANG, J.; LV, Z.; XIN, C.; TAN, C.; ZHAO, M.; WANG, L.; LIU, J.- **AAV vectors applied to the treatment of CNS disorders: Clinical status and challenges-** Journal of Controlled Release Vol. 355, 2023, Pages 458-473

KAUFMANN, B. K.; BÜNING, H; GALY, A.; SCHAMBACH, A.; GREZ, M.- **Gene therapy on the move-** EMBO Mol Med (2013) 5, 1642–1661

KESIDOU, E.; THEOTOKIS, P.; DAMIANIDOU, O.; BOZIKI, M.; KONSTANTINIDOU, N.; TALOUMTZIS, C.; SINTILA, A-S.; GRIGORIADIS, P.; EVANGELOPOULOS, E. M.; BAKIRTZIS, C.; SIMEONIDOU, C.- **CNS Ageing in Health and Neurodegenerative Disorders-** J. Clin. Med. 2023, 12, 2255.

KHADKA, B.; LEE, J-Y.; KIM, K-T.; BAE, J-S.- **Recent progress in therapeutic drug delivery systems for treatment of traumatic CNS injuries-** Future Med. Chem. 10.4155/fmc-2020-0178 (2020)

KIMBEL, J. H.; NILSSON, E.E.; SKINNER, K. N.- **Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Ovarian Disease-** The Ovary (2019) 149–154.

KIMURA, K.; NAGAI, Y.; HATANAKA, G.; FANG, Y.; TANABE, S.; ZHENG, A.; FUJIWARA, M.; NAKANO, M.; HORI, Y.; TAKEUCHI, F. R.; INAGAKI, I.; MINAMIMOTO, T.; FUJITA, I.; INOVE, I-K.; TAKADA, M.- **A mosaic adeno-associated virus vector as a versatile tool that exhibits high levels of transgene expression and neuron specificity in primate brain-** Nature Communications | (2023) 14:4762

KNÖFERLE, J.; KOCH, C. J.; OSTENDORF, T.; MICHEL, U.; PLANCHAMP, V.; VUTOVA, P.; TÖNGES, L.; STADELMANN, C.; BRUCK, W.; BÄHR, M.; LINGOR, P.- **Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo-** PNAS (2010), Vol. 107, N°. 13: 6064–6069

KOSUGA, M.; ENOSAWA, S.; LI, K-X.; SUZUKI, S. S.; MATSU, N.; YAMADA, M.; ROY-CHOWDHURY, J.; KOIWAI, O.; OKUYAMA, T.- **Long-Term Transgene Expression in Rat Liver Using Chicken (5-Actin Promoter Associated with Cytomegalovirus Immediate-Early Enhancer (CAG Promoter) -** Cell Transplantation, Vol. 9, pp. 675-680, 2000

KRITSILIS, M.; RIZOU, V. S.; KOUTSOUDAKI, N. P.; EVANGELOU, K.; GORGOLIS, G. V.; PAPADOPOULOS, D.- **Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease-**Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 2937

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILLIPOWIC, W.- **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay-** Nature Reviews | Genetics (2010) - Vol.11- 597-610

- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P.- **Electroporation-** Cold Spring Harb Protoc (2019) doi:10.1101/pdb.top096271
- LAI, T.; JABAUDON, D.; MAYVEAUX, J. B.; AZIM, E.; ARLOTTA, P.; MENEZES, L. R. J.; MACKLIS, D. J.- **SOX5 Controls the Sequential Generation of Distinct Corticofugal Neuron Subtypes-** Neuron (2008),57, 232–247
- LEEUW, N. C.; DYKA, M. F.; BOYE, L. S.; LAPRISE, S.; ZHOU, M.; CHOU, Y. A.; BORRETTA, L.; McINERNEY, C. S.; BANKS, G. K.; CASAMAR-PORTALES, E.; SWANSON, I. M.; D'SOUZA, A. C.; BOYE, E. S.; JONES, J.-M. S.; HOLT, A. R.; GOLDOWITZ, D.; HAUSWIRTH, W. W.; WASSERMAN, W. W.; SIMPSON, M. E.- **Targeted CNS delivery using human MiniPromoters and demonstrated compatibility with adeno-associated viral vector.** - Molecular Therapy. Methods & Clinical Development (2014) 1, 5
- LEONE, P. D.; SRINIVASAN, K.; CHEN, B.; ALCAMO, E.; McCONNELL, K. S.- **The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex-** Curr Opin Neurobiol. (2008), 18(1): 28–35.
- LI, B.; SUN, H.- **miR-26a promotes neurite outgrowth by repressing PTEN expression.** - Molecular Medicine Reports 8: 676-680, 2013
- LI, C.; BOWLES, E. D.; DYKE, V. T.; SAMULSKI, J. R.- **Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy-** Cancer Gene Ther 2005 Dec;12(12):913-25
- LI, C.; LI, Y.; LU, Y.; NIU, Z.; ZHAO, H.; PENG, Y.; LI, M.- **miR-26 family and its target genes in tumorigenesis and development-** Critical Reviews in Oncology / Hematology 157 (2021) 103124
- LINGOR, P.; KOCH, C. J.; TONGES, L.; BÄHR, M.- **Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS-** Cell Tissue Res (2012) 349:289–311
- LU, X. T.; ROTHENBERG, E. M. - **MicroRNA.-** J Allergy Clin Immunol. 2018; 141(4): 1202–1207.
- MAGALHÃES, E. L. W; THÁ, L. E.; LEME, M. D. - **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA.** Colombo: Embrapa- Florestas, 2018. 12p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 247).
- MAHAR, M.; CAVALLI, V.- **Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration-**Nature Reviews/ Neuroscience- (2018) | vol. 19: 323-337.
- MÄKINEN, I. P.; KOPONEN, K. J.; KÄRKKÄINEN, M.-A.; MALM, M. T.; PULKKINEN, H. K.; KOISTINAHO, J.; TURUNEN, P. M.; HERTTUALA-YLÄ, S.- **Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain-** J Gene Med 2006; 8: 433–441.
- MATURANA, J. C.; VERPEUT, L. J.; KOOSHBAGHI, M.; ENGEL, A. E.- **Novel tool to quantify with single-cell resolution the number of incoming AAV genomes co-expressed in the mouse nervous system-** Gene Therapy (2023) 30:463–468

- MIAO, L.; YANG, L.; HUANG, H.; LIANG, F.; LING, C.; HU, Y. - **mTORC1 is necessary but mTORC2 and GSK3b are inhibitory for AKT3-induced axon regeneration in the central nervous system-** *e Life* 2016;5: e5: e14908.
- MONFARED, S. G.; ERTL, P.; ROTHBAUER, M.- **Microfluidic and Lab-on-a-Chip Systems for Cutaneous Wound Healing Studies-** *Pharmaceutics* 2021, 13, 793.
- MOORE, L. D.; BLACKYMORE, G. M.; HU, Y.; KAESTNER, H. K.; BIXBY, L. J.; LEMMON, P.V.; GOLDBERG, L.M.- **KLF Family Members Regulate Intrinsic Axon Regeneration Ability-** *Science*. 2009; 326(5950): 298–301.
- MORRIS, R.; KERSHAW, J.N.; BABON, J.J.- **The molecular details of cytokine signaling**
- MOSMANN T. - **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2):55-63. 1983.
- MUSI, A. C.; AGRO, G.; SANTARELLA, F.; IERVASI, E.; BORSELLO, T.- **JNK3 as Therapeutic Target and Biomarker in Neurodegenerative and Neurodevelopmental Brain Diseases-** *Cells* 2020, 9, 2190
- NASO, F. M.; TOMKOWICZ, B.; PERY, L. W. 3<sup>o</sup>; STROHL, R. W.- **Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy-** *Bio Drugs* (2017) 31:317–334
- NAUDET, N.; MOUTAL, A.; VU, N. H.; CHOUNLAMOUNTRI, N.; WATRIN, C.; CAVAGNA, S.; MALLEVAL, C.; BENETOLLO, C.; BARDEL, C.; DRONNE, A-M.; HONNORAT, J.; MEISSIREL, C.; BESANÇON, R.- **Transcriptional regulation of CRMP5 controls neurite outgrowth through Sox5-** *Cell. Mol. Life Sci.* (2018) 75:67–79
- NIWA, H.; YAMAMURA, I-K.; MIYAZOKI, I-J.- **Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector-** *Gene*, 108 (1991) 193-200
- OHTAKE, Y.; HAYAT, U.; LI, S.- **PTEN inhibition and axon regeneration and neural repair-** *Neural regeneration Research*. 2015;10(9):1363-1368
- OSSINGER, A.; BAJIC, A.; ANDERSSON, B.; RANEFALL, P.; HAILER, N-P.; SCHIZAS, N.- **A rapid and accurate method to quantify neurite outgrowth from cell and tissue cultures: Two image analytic approaches using adaptive thresholds or machine learning-** *Journal of Neuroscience Methods*-Vol.331,(2020).
- PEÑA-BAUTISTA, C.; CASAS-FERNÁNDEZ, E.; VENTO, M.; BAQUERO, M.; CHÁFER-PERICÁS, C. - **Stress and Neurodegeneration-** *Clinica Chimica Acta* 503 (2020) 163–168
- RAMALHO, S. B.; ALMEIDA, M. F.; MARTINEZ, B.M.A- **Cell therapy and delivery strategies for spinal cord injury.** *Histol Histopathol* (2021) 36: 907-920.
- REESCANEAR, Y-P.; RALLIÉRE, C.- **A Sox5 gene is expressed in the myogenic lineage during trout embryonic development-** *Int. J. Dev. Biol.* (2010). 54: 913-918

- RÉTHELYI, M. J.; VINCZE, K.; SCHALL, D.; GLENNON, J.; BERKEL, S.- **The role of insulin/IGF1 signalling in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders – Evidence from human neuronal cell models-** Neuroscience & Biobehavioral Reviews, (2023), Vol. 153, 105330.
- RIBAS, T. V.; COSTA, R. M. - **Gene Manipulation Strategies to Identify Molecular Regulators of Axon Regeneration in the Central Nervous System-** Frontiers in Cellular Neuroscience– (2017) Volume 11/ article 231
- RISS, L.T.; MORAVEC, A. R.; NILES, R. A; DUELLMAN, S.; BENINK, A. H.; WORZELLA, J. T.; MINOR, L.- **Cell Viability Assays-** U.S. National Library of Medicine. 2016; 25 p.
- ROGERS, S.; PFUDERER, P.- **Use of viroses as carriers of added genetic information-** Nature-, vol. 29, 1968-749-751.
- ROSELL, L. A.; NEUKOMM, J. L.- **Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in Disease-** Open Biol. 9: 190118.
- RUPAIMOOLE, R.; FOLGA, J. F.- **MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases-** Nature Reviews | Drug Discoveru- (2017) / Vol.16: 203-221
- SAAD, H.; SEILLIER, M.; CARRIER, A.- **The stress protein TP53INP1 plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis-** Biochimie. (2015), 118: 44-50.
- SALIMINEJAD, K.; KHORSHID, K. R. H.; FARD, S. S.; GHAFFARI, H. S.- **An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis Methods-** J Cell Physiol. 2019; 234:5451–5465.
- SAYED, N.; ALLAWADHI, P.; KHURANA, A.; SINGH, V.; NAVIK, U.; PASUMARTHI, K. S.; KHURANA, I.; BANOTHU, K. A.; WEISKIRCHEN, P.; BHARANI, K. K.- **Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications-** Life Sciences 294 (2022) 120375
- SHAHROR, A.R.; WU, C. C.; CHIANG, H.-Y.; CHEN, Y.-K.- **Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: The Next Generation of Stem Cell-Based Therapy for TBI-** Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 4051
- SHOLL, D.A.- **Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat.** J. Anat.87,387-406. 1953.
- SMITH, P.; SUM, F.; PARK, K. K.; CAI, B.; WANG, C.; KUWAKO, K.; MARTINEZ-CARRASCO, I.; CONOLLY, L.; HE, Z.- **SOCS3 Deletion Promotes Optic Nerve Regeneration In Vivo-** Neuron Report-(2009) - Neuron 64, 617–623
- STEPANKOVA, K.; JENDELOVA, P.; URDZIKOVA, M. L. - **Planet of the AAVs: The Spinal Cord Injury Episode-**Biomedicines 2021, 9, 613.

SU, L.; SONG, X.; XUE, Z.; ZHENG, C.; YIN, H.; WEI, H.- **Network analysis of microRNAs, transcription factors, and target genes involved in axon regeneration-** Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), (2018). 19(4):293-304.

SU, Y.; DENG, M-F.; XIONG, W.; XIE, A-J.; GUO, J.; LIANG, Z-H.; HU, B.; CHEN, J-G.; ZHU, X.; MAN, H-Y; LU, Y.; LIU, D.; TANG, B.; ZHU, L-Q.- **MicroRNA-26a/Death-Associated Protein Kinase 1 Signaling Induces Synucleinopathy and Dopaminergic Neuron Degeneration in Parkinson's Disease-** Biological Psychiatry, (2019); 85:769–781

SUCKOW, A. M.; WEISBROTH, H. S.; FRANKLIN, L. C.- **The Laboratory Rat.** 2ª edição, Elsevier 2006, pp 929.

SUDHAKAR, V.; RICHARDSON, M. R. - **Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases-** Neurotherapeutics (2019) 16:166–175

SUH, R-M.; LEE, Y.; KIM, Y J.; KIM, K-S.; MOON, H-S.; LEE, Y-K; CHUNG, M.H.; YOON, S.H.; MOON, Y. S.; KIM, N.V.; KIM, S.K.- **Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs-** Developmental Biology 270 (2004) 488 – 498

TANG, R.; XU, Z. - **Gene therapy: a double-edged sword with great powers.** Molecular and Cellular Biochemistry (2020) 474:73–81

UYEDA, A.; MURAMATSU, R.- **Molecular Mechanisms of Central Nervous System Axonal Regeneration and Remyelination: A Review-**Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8116

VAHSEN, F. B.; RIBAS, T. V.; SUNDERMEYER, J.; BAECKER, A.; DAMBECK, V.; LENZ, C.; SHOMRONI, O.; GOMES, C. L.; TATENHORS, L.; BARSKI, E.; ROSER, E.-A.; MICHEL, U.; URLAUB, H.; SALINAS, G.; BÄHR, M.; KOCH, C. J.; LINGOR, P.- **Inhibition of the autophagic protein ULK1 attenuates axonal degeneration in vitro and in vivo, enhances translation, and modulates splicing-** Cell Death & Differentiation (2020) 27:2810–2827

VARADARAJAN, G. S.; HUNYARA, L. J.; HAMILTON, R. N.; KOLODINK, L. A.; HUBERMAN, D. A.- **Central nervous system regeneration-** Cell Press- Cell 185, January 6, 2022.

WALTHERS, M.C.; SEIDLITS, K.S.- **Gene Delivery Strategies to Promote Spinal Cord Repair-** Biomarker Insights 2015:10

WANG, T. J.; MEDRESS, A. Z.; BARRES, A. B.- **Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway-** The Rockefeller University Press J. Cell Biol. (2012), Vol. 196 No. 1, 7–18

WEN-YUAN, L.; WANG, Y.; ZHAI, G-F.; SUN, P.; CHENG, X-Y.; DENG, X-L.; WANG, Y-Z.- **AAV-KLF7 Promotes Descending Propriospinal Neuron Axonal Plasticity after Spinal Cord Injury-** Neural Plasticity, Vol. 2017, Article ID 1621629.

WERNER, H.- **The IGF1 Signaling Pathway: From Basic Concepts to Therapeutic Opportunities-** Int. J. Mol. Sci. (2023), 24, 14882.

- WILLIAMS, R. P.; BENOWITZ, I.L.; GOLDBERG, L.J.; HE, Z.- **Axon Regeneration in the Mammalian Optic Nerve-** Annual Review of Vision Science. 2020. 6:195–213
- WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S.- **History of gene therapy-** Gene, 525(2), 162–169.
- WONG, M. K. W.; SORENSEN, E. A.; JOGLEKAR, V. M.; KARDIKAR, A.A.; DALGAARD, T. L.- **Non-Coding RNA in Pancreas and  $\beta$ -Cell Development-** Non-Coding RNA 2019, 4, 41
- XIAOXIAO, Z.; LIU, F.; YANG, F.; MENG, Z.; ZENG, Y.- **Selectivity of Exportin 5 binding to human precursor microRNAs-** RNA Biology 2021, Vol. 18, NO. S2, 730–737
- YAN, J.; PAN, Y.; ZHENG, X.; ZHY, C.; ZHANG, Y.; SHI, G.; YAO, L.; CHEN, Y.; XU, N.- **Comparative Study of ROCK1 and ROCK2 in Hippocampal Spine Formation and Synaptic Function-** Neurosci. Bull. (2019), 35(4):649–660
- YANG, L; MIAO, L.; LIANG, F.; HUANG, H.; TENG, X.; LI, S.; NURIDDINOV, J.; SELZER, E.M.; HU, Y.- **The mTORC1 effectors S6K1 and 4E-BP play different roles in CNS axon regeneration-** NATURE COMMUNICATIONS 5: 5416 (2014).
- YE, L.; FAN, C.; WANG, L.; LAN, T.; GAO, R.; WANG, W.; YU, Y. S.- **MicroRNA-26a-3p rescues depression-like behaviors in male rats via preventing hippocampal neuronal anomalies-**J Clin Invest. 2021;131(16).
- YEW, S. N. - **Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design-** Advanced Drug Delivery Reviews- Vol. 57, (2005), 769-780
- ZANETTI, O.; SOLERTE, B. S.; CANTONI, F.- **Life Expectancy in Alzheimer’s Disease (AD)-** Arch Gerontol Geriatr. (2009):49 Supl. 1:237-43