

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Maria Clara Cordeiro Fernandes

**PAPEL DO CLUSTER MIR-17~92 NO CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE
NEURITOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS CORTICAIS**

Belo Horizonte

2023

Maria Clara Cordeiro Fernandes

**PAPEL DO CLUSTER MIR-17~92 NO CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE
NEURITOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS CORTICAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Toledo Ribas

Belo Horizonte

2023

043

Fernandes, Maria Clara Cordeiro.

Papel do cluster miR-17~92 no crescimento e regeneração de neuritos em cultura primária de neurônios corticais [manuscrito] / Maria Clara Cordeiro Fernandes. – 2023.

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

Orientador: Prof. 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. Doenças Neurodegenerativas. 3. Terapia Genética. 4. Regeneração. 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
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA CLARA CORDEIRO FERNANDES

Prezados(as) Professores(as), bom dia.

Por gentileza, seguem a ata de defesa da aluna Maria Clara Cordeiro Fernandes, disponível no processo 23072.248365/2023-70 - Ata 2531684, para assinatura.

Às oito horas do dia 24 de julho de 2023, 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: "PAPEL DO CLUSTER MIR-17-92 NO CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE NEURITOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS CORTICAIS", 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. Aristóbolo Mendes da Silva	UFMG	APROVADA
Dr. Cleiton Lopes Aguiar	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, 24 de julho de 2023.

Dr. Vinicius de Toledo Ribas (Orientador) _____

Dr. Aristóboło Mendes da Silva _____

Dr. Cleiton Lopes Aguiar _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Atenciosamente,

Secretaria PPGBioCel



Documento assinado eletronicamente por **Aristobolo Mendes da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 09/08/2023, às 08:44, 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 15/08/2023, às 08:15, 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 **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 15/08/2023, às 18:41, 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 **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Coordenador(a)**, em 15/09/2023, às 15:28, 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, informando o código verificador 2531684 e o código CRC E508FD21.

Ao belo presente da vida, com todas suas alegrias, desafios e mistérios. Dedico minha gratidão e inabalável apreciação de cada momento.

AGRADECIMENTOS

Durante esses anos de mestrado, repletos de muito estudo, esforço e dedicação, gostaria de expressar minha gratidão às pessoas essenciais que contribuíram para a realização desse sonho:

A Deus acima de tudo, pois sem Ele nada seria possível. Agradeço pelo dom da vida e por me dar a perseverança para nunca desistir. Obrigada por me guiar no caminho certo.

À minha família, em especial aos meus pais, Marcos e Elaine, expresso minha gratidão hoje e sempre pelo amor, apoio, dedicação e a educação que me proporcionaram. Obrigada por acreditarem em mim, por suas orações e por ir além para tornar meus sonhos realidade. Vocês são as inspirações da minha vida e meu apoio inabalável. Aos meus irmãos, João e Miguel, obrigada pelo laço de irmandade e companheirismo. À minha avó Cleuza e ao meu avô Nico (in memoriam), obrigada pelas orações e ensinamentos. Suas vidas têm sido uma inspiração para mim. À minha grande família, obrigada pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

Aos meus amigos Juliana, Thaís, Luciana e Victor, pela constante motivação e apoio na conquista dos meus objetivos. Sou profundamente grata pelo companheirismo e pelos momentos de risadas que tornaram esse período mais leve.

Ao meu orientador, professor Vinicius Ribas, por me acolher no momento que mais precisei. Obrigada por acreditar e confiar em mim. Você é o melhor orientador que eu poderia ter, e nada disso seria possível sem a sua ajuda. Obrigada por me ensinar e conduzir a pesquisa da melhor maneira. A todos os colegas do grupo RibasTeam, obrigada pelas aprendizagens compartilhadas, pela amizade, pelas conversas e risos no laboratório. Aos colegas e professores do Laboratório de Neurobiologia "Conceição Machado", obrigada pela troca de experiências, camaradagem e por criar um ambiente alegre para todos nós.

Gostaria de agradecer aos colaboradores, Professor Uwe Michel da Universidade de Goettingen, por gentilmente nos fornecer os vetores virais para esta pesquisa, e Professora Erika Jorge e sua aluna Júlia Meireles pela assistência com os ensaios de viabilidade celular.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela excelência. E à UFMG, por ser um lugar de aconchego e um polo de pesquisa onde amo estar.

À CAPES por ser o principal investidor e financiador desta pesquisa, e às demais agências de fomento, CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

Os distúrbios neurodegenerativos (DN) são um grupo de condições, incluindo doenças neurodegenerativas crônicas e lesões traumáticas agudas, que levam à neurodegeneração e déficits neurológicos permanentes. Nos DN, os axônios são afetados precocemente, perdem sua função estrutural e sofrem degeneração axonal. Além disso, neurônios maduros quando lesados não regeneram seus axônios, o que leva a danos permanentes. Portanto, é necessário buscar novas terapias para conter a degeneração axonal e promover sua regeneração, com o objetivo de restaurar a função neuronal. MicroRNAs (miRNAs) são alvos promissores para promover proteção e regeneração axonal. O cluster miR-17~92, alvo deste estudo, regula diferentes genes envolvidos em processos neurodegenerativos e regenerativos. Por esta razão, o miR-17~92 pode ser considerado uma promissora ferramenta de modulação genética para DN. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da superexpressão do cluster miR-17~92, mediada por vetores de vírus adeno-associados (AAV), no crescimento e regeneração de neuritos e axônios no sistema nervoso central (SNC) usando modelos *in vitro*. Os experimentos envolvendo animais foram realizados com a aprovação do comitê de ética para experimentação animal da UFMG (237/2018). Primeiro, culturas de neurônios corticais primários foram preparadas a partir de embriões de ratos Wistar de 18 dias. As culturas foram transduzidas com vetores de AAV, o vetor de controle expressando apenas o gene repórter mCherry (AAV.CTRL) e o vetor experimental que consiste no gene repórter mCherry e o cluster miR-17~92 (AAV.miR-17~92). Após diferentes momentos, análises imunocitoquímicas foram realizadas para avaliar crescimento, arborização e regeneração de neuritos e regeneração de axônios nas culturas neuronais. Observou-se que os vetores AAV.miR-17~92 e AAV.CTRL foram capazes de transduzir eficientemente neurônios corticais primários *in vitro*, conforme avaliado pela fluorescência de mCherry nesses neurônios sem provocar citotoxicidade diferencial entre eles. A transdução com AAV.miR-17~92 foi capaz de aumentar o crescimento e a complexidade da arborização de neuritos em comparação com o AAV.CTRL. Análises preliminares mostraram uma tendência ao aumento da regeneração de neuritos induzida pelo AAV.miR-17~92 e também uma maior regeneração axonal, porém experimentos adicionais são necessários para confirmar esses efeitos. Uma análise de bioinformática identificou 251 mRNAs alvos do cluster AAV.miR-17~92. A avaliação de ontologia gênica dos genes codificadores dos mRNAs alvos mostrou que esses genes podem estar envolvidos com crescimento e regeneração de neuritos. Em conclusão, os dados deste trabalho mostram que o cluster miR-17~92 é capaz de aumentar o crescimento de neuritos e a complexidade de sua arborização em neurônios corticais primários, sugerindo que este miRNA pode ter um efeito benéfico na regeneração no SNC. Este trabalho pode fornecer uma melhor compreensão do papel do cluster miR-17~92 na regeneração após danos no SNC, que pode ser importante para o desenvolvimento de novos tratamentos para DN.

Palavras-chave: neurodegeneração, distúrbios neurodegenerativos, terapia gênica, regeneração, microRNA.

ABSTRACT

Neurodegenerative disorders (ND) are a group of conditions, including chronic neurodegenerative diseases and acute traumatic injuries, that lead to neurodegeneration and permanent neurological deficits. In ND, axons are affected early, lose their structural function and suffer axonal degeneration. Furthermore, mature neurons when injured do not regenerate their axons, which leads to permanent deficits. Therefore, it is necessary to seek new therapies to contain axonal degeneration and promote its regeneration, with the aim of restoring neuronal function. MicroRNAs (miRNAs) are promising targets to promote axonal protection and regeneration. The cluster miR-17~92, target of this study, regulates different genes involved in neurodegenerative and regenerative processes. For this reason, miR-17~92 can be considered a promising genetic modulation tool for ND. The aim of this study was to evaluate the effect of the overexpression of the miR-17~92 cluster, mediated by adeno-associated viral (AAV) vectors, on the growth and regeneration of neurites and axons in the central nervous system (CNS) using *in vitro* models. The experiments involving animals were carried out with the approval of the ethics committee for animal experimentation at UFMG (237/2018). First, cultures of primary cortical neurons were prepared from 18-day-old Wistar rat embryos. Cultures were transduced with AAV vectors, the control vector expressing only the mCherry reporter gene (AAV.CTRL) and the experimental vector consisting of the mCherry reporter gene and the miR-17~92 cluster (AAV.miR-17~92). After different time points, immunocytochemical analyses were performed to evaluate neurite growth, branching and regeneration, as well as axonal regeneration in neuronal cultures. The AAV.miR-17~92 and AAV.CTRL vectors were able to efficiently transduce primary cortical neurons *in vitro*, as assessed by mCherry fluorescence in these neurons, without induce differential cytotoxicity. Transduction with AAV.miR-17~92 increases neurite outgrowth and branching compared to AAV.CTRL. Preliminary analysis showed a trend toward increased neurite regeneration induced by AAV.miR-17~92, as well as increased axonal regeneration, but further experiments are necessary to confirm these effects. Bioinformatic analysis identified 251 target mRNAs of the miR-17~92 cluster. A gene ontology analysis of the genes that codified the target mRNAs showed that those genes could be involved in neurite growth and regeneration. In conclusion, this study showed that the miR-17~92 cluster is able to promote neurite outgrowth and branching in primary cortical neurons, suggesting that this miRNA could be beneficial to promote regeneration in the CNS. This work may provide a better understanding of the role of the miR-17~92 cluster in regeneration after CNS damage, which could be important to the development of new treatments to DN.

Keywords: neurodegeneration, neurodegenerative disorders, gene therapy, growth, regeneration, miR-17~92.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Degeneração Axonal.....	18
Figura 2 - Biogênese miRNA.....	21
Figura 3 - Conjuntos Homólogos.....	23
Figura 4 - Mapa dos Vetores Virais.....	27
Figura 5 - Câmara Microfluídica.....	31
Figura 6 - Efetividade e Citotoxicidade dos Vetores de AAV.....	33
Figura 7 - Avaliação do Crescimento Neurítico.....	35
Figura 8 - Análise de Sholl.....	37
Figura 9 - Regeneração de Neuritos após Lesão do Tipo Scratch.....	39
Figura 10 - Regeneração Axonal.....	41
Figura 11 - Análise dos mRNAs alvos do Cluster MIR-17~92 Por Ontologia Gênica	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3'UTR - Região 3' não traduzível
- Aap - Proteínas acessórias associadas
- AAV - Vetores virais Adeno-Associados
- AAV-2 - Vetor vírus adeno-associado sorotipo 2
- AGO - Argonauta
- AMPK - 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase ativada
- BCL2L11 - Proteína semelhante a Bcl-2 11
- cAMP ou AMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- CEUA - Comitê de ética para uso de animais
- CSPGs - Proteoglicanos de sulfato de condroitina
- CTGF - Fator de crescimento do tecido conjuntivo
- Dapi - 4,6-diamidino-2-fenilindol
- DNA - Ácido desoxiribonucleico
- E2 - Fator de transcrição
- GEFs - Fatores de troca de nucleotídeos de guanina
- GTPases - Enzimas hidrolases que hidrolisam o GTP
- HEK 293 - Células embrionárias de fígado humanas
- ITR - Regiões de repetições terminais invertidas
- KIAA0319 - proteína transmembranar de desenvolvimento cerebral
- KLFs (6, 7 ,9 e 13) - Família de proteínas semelhantes a Kruppel
- MAG - Glicoproteína associada à mielina
- miRNAs - microRNA
- mRNA - RNA mensageiro
- mTOR - Alvo mecanicista da rapamicina
- MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)
- NG2 - Antígeno Neural/Glial 2
- NGF - Fator de crescimento neural
- NGF-TrkA - Via de sinalização
- NogoA - Proteína de membrana de oligodendrócitos associada à mielina
- OMGp - Glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
- PBS - Salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase
PDL - Poli-D-Lisina
PFA - Paraformaldeído
PLO - Poli-L-Ornitina
pré-miRNA - Precursor de miRNA maduro
pri-miRNA - Transcrito primário de miRNA
PTEN - Homólogo da fosfatase/tensina
Rab5 - Endossomo inicial
Rab7 - Endossomo tardio
Rep - Replicação
RISC - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA - Ácido ribonucleico
RNA pol II - Emzina RNA polimerase II
RPM - rotações por minuto
Smad2 - Proteínas de transmissão de sinais de TGF β
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
SOX11 - SRY-box fator de transcrição 11
TGF- β - Fator de crescimento transformante beta
Tuj1 - Anticorpo para β -Tubulina 3
wtAAV - Vetor vírus adeno-associado selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Neurodegeneração do Sistema Nervoso Central	16
1.2 Degeneração Axonal	17
1.3 Regeneração Axonal	19
1.4 MicroRNAs.....	20
1.5 Cluster MiR-17~92.....	22
1.6 Modulação genética por vetores de vírus adeno-associados (AAV).....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Vetores de Vírus Adeno-Associados (AAV) recombinantes	26
4.3 Cultura primária de neurônios corticais.....	27
4.4 Teste de eficácia de transdução viral.....	28
4.5 Ensaio de viabilidade celular	28
4.6 Imunocitoquímica.....	29
4.7 Crescimento de neuritos	29
4.8 Complexidade da arborização dos neuritos.....	30
4.9 Regeneração de neuritos.....	30
4.10 Regeneração de axônios	30
4.11 Bioinformática	31
4.12 Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Eficácia da transdução e análise de citotoxicidade dos vetores de AAV	32
5.2 Superexpressão do cluster miR-17~92 aumenta o crescimento neurítico....	34
5.2 Complexidade de arborização neurítica por análise do Sholl	36
5.3 Regeneração neurítica após lesão do tipo <i>scratch</i>	38
5.4 Análise de regeneração axonal de neurônios plaqueados em câmaras microfluídicas.....	39

5.5 Análise de Bioinformática	42
6. DISCUSSÃO	43
6.1 miRNA-17~92 e o crescimento e a complexidade neurítica	44
6.2 Regeneração e o cluster.....	45
6.3 Alvos do cluster miR-17~92	46
6.1.1 A via PTEN/TSC1/mTOR	47
6.1.2 Krüppel-Like Factor 13	48
6.1.3 Rab5.....	48
6.1.4 Smad2.....	49
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neurodegeneração do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é composto por uma rede de células que controla o corpo e sua interação com o meio ambiente (LUDWIG, REDDY; VARACALLO, 2017). Esse sistema é dividido em encéfalo e medula espinal, e sua unidade funcional é o neurônio (BRIAN *et al.*, 2011; THAU, REDDY; SINGH, 2019). Existem aproximadamente 86 bilhões de neurônios no encéfalo humano (HERCULANO-HOUZEL, 2012), que têm funções de receber e enviar estímulos através de sinapses, além de serem responsáveis pela geração de pensamentos, memórias, emoções, movimentos e sensações (LUDWIG, REDDY; VARACALLO, 2017; THAU, REDDY; SINGH, 2019). Os neurônios possuem dois tipos de prolongamentos, os dendritos, que recebem estímulos e os axônios, que são prolongamentos mais longos e transmitem os estímulos (GOAILLARD *et al.*, 2020). Quando ocorre qualquer dano ao axônio, o neurônio afetado perde a sua função e entra em um processo neurodegenerativo (MURAMATSU; YAMASHITA, 2014;).

Os distúrbios neurodegenerativos compreendem doenças crônicas e lesões traumáticas que causam a perda progressiva funcional e estrutural de redes neurais específicas (GUIDOBONI *et al.*, 2020; KOVACS, 2019), déficits neurológicos permanentes (WOLLER, *et al.*, 2022), como perda da função motora, sensorial, autonômica e cognitiva (ELI; LERNER, 2021; KOVACS, 2019) e até a morte dos neurônios afetados (CHI; CHANG; SANG, 2018). Dentre os distúrbios neurodegenerativos estão as doenças crônicas, como a Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e Doença de Huntington, que são algumas das principais causas de morte no mundo (GUIDOBONI *et al.*, 2020). Essas doenças possuem uma série de similaridades em relação à fisiopatologia tais como agregação de proteínas, disfunção mitocondrial e proteolítico e neuroinflamação (KOVACS, 2019; MUDDAPU *et al.*, 2020). A perda de neurônios varia conforme a doença, porém na maioria delas essa perda celular se espalha para as regiões corticais (MUDDAPU *et al.*, 2020).

Por outro lado, as lesões traumáticas que incluem lesões medulares e lesões encefálicas são as causas por eventos traumáticos, ocasionando também disfunções motoras, autonômicas e cognitivas, podendo ser de caráter temporário

ou permanente (AHUJA *et al.*, 2017; ELI; LERNER, 2021). A fisiopatologia é composta de duas fases, a fase inicial, que é a lesão axonal, ruptura de vasos sanguíneos, hipóxia e rompimento de membranas celulares, causados pelo dano mecânico. E a fase secundária, que é derivada dos danos primários (ZHANG *et al.*, 2021) e é onde ocorre formação de edemas, aumento de radicais livres, perda de homeostasia neuronal, cicatrização e morte neuronal (AHUJA *et al.*, 2017). Portanto, tanto as doenças crônicas como as lesões traumáticas afetam neurônios, levando assim um processo neurodegenerativo e, conseqüentemente, a déficits neurológicos. Com a progressão da degeneração tecidual e a falha regenerativa do sistema, a neurodegeneração torna-se um distúrbio sem cura (MUDDAPU *et al.*, 2020).

1.2 Degeneração Axonal

Como exposto anteriormente, os neurônios têm dois tipos de prolongamentos: o axônio e os dendritos, sendo o primeiro, o mais importante (BRIAN *et al.*, 2011). Os prolongamentos axonais são imprescindíveis para a comunicação cerebral através de disparos de potenciais de ação e do contato com outras células pelas sinapses (SHEKARI; FAHNESTOCK, 2022). O axônio apresenta uma malha de citoesqueleto, contendo microtúbulos, neurofilamentos, filamentos de actina, entre outros, que asseguram a sua função estrutural (DE ROOIJ; KUHL 2018). Quando a estrutura axonal é alterada, seja por lesões ou doenças crônicas, os axônios podem perder sua função precocemente e passar um por um processo de desintegração, que ocorre antes da morte neuronal, chamada de degeneração axonal (ARAKI, 2021; WANG; MEDRESS; BARRES, 2012).

A degeneração axonal é o processo inicial para degeneração e disfunção somática do neurônio (LLOBET ROSELL; NEUKOMM, 2019) e é seu estudo um passo importante para entender os eventos precoces em distúrbios neurodegenerativos. Tanto a ruptura de membranas no axônio, causadas pela lesão, quanto a agregação proteica, das doenças podem causar comprometimento axonal e levar à neurodegeneração (COLEMAN; HÖKE, 2020.). O processo degenerativo acontece de forma sequencial, primeiramente ocorre a degeneração aguda, depois a degeneração Walleriana e por fim a degeneração retrógrada lenta (WANG; MEDRESS; BARRES, 2012). A fase aguda sucede a lesão é um processo de desintegração de curta distância em que o axônio sofre uma fragmentação do coto proximal e distal por cerca de 500 µm do local da lesão. É caracterizada pelo rápido

influxo de cálcio que faz com que o gradiente iônico (RIBAS *et al.*, 2017) fique desregulado, perturbando vias de sinalização (EGAWA *et al.*, 2017) e ativando calpaínas que são proteases que clivam o citoesqueleto causando uma parada no transporte axonal e uma desestabilização da estrutura axonal (ZHANG; KOCH, 2017). Por conseguinte, há a ruptura da membrana axonal e fragmentação do conteúdo axonal, fazendo com que o axônio não possa mais se comunicar com outras células e levando a perda da função do neurônio (KNÖFERLE *et al.*, 2010. KERSCHENSTEINER, *et al.*, 2005) A degeneração Walleriana é caracterizada pela fragmentação total do coto distal de forma semelhante ao que ocorre na degeneração aguda (COLEMAN; HÖKE, 2020; VARADARAJAN *et al.*, 2022). O evento acontece de 24 a 72h após lesão e seus fragmentos são retirados por células fagocíticas (SINGH, *et al.*, 2017). O coto proximal se fragmenta por degeneração retrógrada (Dying back), de forma diferente à degeneração Walleriana, pois é progressiva em direção ao corpo celular (Figura 1) (WANG; MEDRESS; BARRES, 2012). Em conclusão, quando o axônio entra em um processo degenerativo, o neurônio perde a sua função, mesmo que o corpo celular tenha sobrevivido ao processo degenerativo (KNÖFERLE *et al.*, 2010). Para retomar sua função o neurônio precisa regenerar seu axônio, algo que não acontece espontaneamente no SNC de mamíferos adultos (VARADARAJAN *et al.*, 2022).

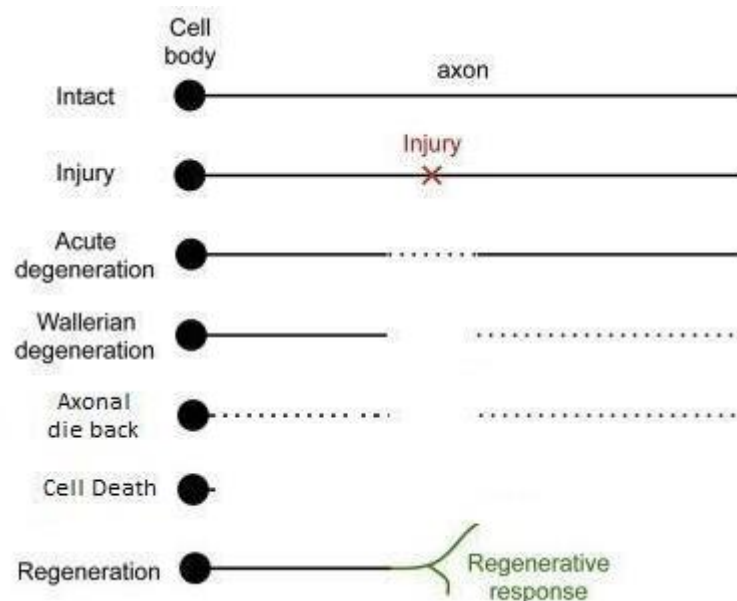


Figura 1 - Degeneração axonal. Figura ilustrativa representando a degeneração axonal. O axônio do neurônio intacto quando sofre lesão sofre degeneração. A degeneração aguda é a fase primária em que o axônio se rompe e se fragmenta em coto proximal e distal. Na degeneração Walleriana e retrógrada os fragmentos distal e proximal, respectivamente, se desintegram (Adaptado de ZHENG, LORENZA e MA, 2019)

1.3 Regeneração Axonal

Como mencionado anteriormente, os distúrbios neurodegenerativos do SNC causam danos irreversíveis (RIBAS; COSTA, 2017). Isso ocorre pelo fato de que, os neurônios do SNC de mamíferos maduros falham ao regenerar-se após lesão, devido à fatores intrínsecos e ao microambiente inibitório no qual se encontram (ILLIS, 2012), que desfavorecem a regeneração impedindo a formação de cones de crescimento e a extensão do axônio.

O microambiente inibitório da regeneração axonal é constituído, em parte, pela chamada cicatriz glial (UYEDA; MURAMATSU, 2020). A fim de evitar a progressão da lesão, células inflamatórias e gliais se tornam reativas e migram para o local lesionado para restabelecer a homeostase celular (LI *et al.*, 2020). Para cicatrizar a lesão, as células gliais produzem e secretam moléculas de matriz extracelular como NG2 e proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs) (DE FRERIA, *et al.*, 2021). Além disso, debris celulares derivados de células lesadas, como debris de mielina, permanecem no local da lesão e não são removidos de maneira eficiente por células fagocíticas (VARADARAJAN *et al.*, 2022). Esses debris de mielina expressam em sua membrana proteínas que também são inibidoras da regeneração axonal, como NogoA, MAG e OMgp (YIU; HE, 2006.). Outro fator importante é a inflamação causada pela ruptura de vasos sanguíneos na região e a neovascularização local (AHUJA. *et al.*, 2017; DONNELLY; POPOVICH, 2008) Todos esses fatores extrínsecos contribuem para a falta de resposta regenerativa do CNS. Já o Sistema Nervoso Periférico (SNP) tem uma capacidade regenerativa diferente do SNC, devido a respostas primárias de cada sistema à lesão. No SNP, as células de Schwann têm um papel diferencial na remoção de debris celulares (VARADARAJAN *et al.*, 2022), o ambiente é mais permissivo à regeneração e, por fim, a capacidade intrínseca dos neurônios do SNP é diferente em relação ao SNC (HUEBNER; STRITTMATTER, 2009; LI *et al.*, 2020)

A capacidade intrínseca para o crescimento dos axônios é outro fator determinante na resposta regenerativa e recuperação funcional dos neurônios. No SNC, após o nascimento, algumas vias de sinalização e genes, antes ativos nos neurônios em desenvolvimento, agora são silenciados em neurônios maduros influenciando na capacidade regenerativa intrínseca (LIU *et al.*, 2011; VARADARAJAN *et al.*, 2022.) A via de sinalização de mTOR, que modula a sobrevivência e crescimento celular está aumentada em células embrionárias,

porém a inibição desta via pela fosfatase homóloga à tensina (PTEN) diminui a atividade da via de mTOR na fase adulta (PARK *et al.*, 2008). Um dos efeitos mais robustos de modulação gênica sobre a regeneração axonal foi mostrado pela deleção de PTEN, que leva a uma regulação positiva de mTOR e a regeneração axonal robusta em modelos de esmagamento do nervo óptico e de lesão medular (LIU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2008). Outros fatores intrínsecos importantes que regulam a regeneração axonal são os fatores de transcrição da família de proteínas semelhantes a Kruppel (KLFs), que possuem efeitos diferentes no crescimento axonal. Enquanto KLF4 e 9 são reguladores negativos da regeneração axonal, KLF6 e 7 são reguladores positivos do crescimento axonal (BLACKMORE *et al.*, 2012; MOORE *et al.*, 2009). Sox11 é um fator de transcrição que promove a regeneração em neurônios adultos por meio da ativação de outras vias de crescimento axonal (QIAN; ZHOU, 2020; WANG *et al.*, 2015). E assim como esses, há inúmeras vias de sinalização e genes que são alterados e regulam a regeneração axonal (QIAN; ZHOU, 2020; RIBAS; COSTA, 2017).

A possibilidade de regeneração de neurônios do SNC é um alvo terapêutico muito promissor para tratamento de distúrbios neurodegenerativos e como o SNC não se regenera naturalmente, estudar moléculas que auxiliam na regeneração é importante (Figura 1). A regeneração axonal é resultado de vários processos celulares, e por isso, é razoável de se pensar que não é somente um gene que será capaz de regular todo o crescimento, e sim, vários genes atuando de modo concomitante conduzindo a regeneração. Portanto, estudar moléculas que são capazes de regular a expressão gênica, como os microRNAs (miRNAs), é uma interessante estratégia terapêutica. Segundo UYEDA; MURAMATSU (2020), grande número de miRNAs foram encontrados em lesões no SNC, supondo seu papel na degeneração e regeneração do neurônio.

1.4 MicroRNAs

Os miRNAs são uma classe de RNAs não codificantes, que têm cerca de 22 nucleotídeos de extensão e são caracterizados por regular negativamente (SUN *et al.*, 2018) genes codificadores, reprimindo a tradução ou induzindo a degradação de RNAs mensageiros-alvo (mRNA) através do pareamento de bases (Figura 2) (HILL e TRAN, 2021; POMPER *et al.*, 2020). Os miRNAs se ligam aos mRNA, em geral, pela sua região 3'UTR. A complementaridade de bases, geralmente incompleta, entre os dois transcritos permite que um mesmo miRNA regule a transcrição de

vários outros mRNAs diferentes em uma mesma célula (POMPER *et al.*, 2020). Se o miRNAs sofrer alguma alteração em sua expressão, a regulação do mRNA-alvo pode ser afetada influenciando na homeostase celular (HILL e TRAN, 2021). Os miRNAs estão envolvidos em praticamente todos os processos celulares, como metabolismo celular, diferenciação e morte celular, proliferação celular e respostas imunológicas (EULALIO; HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2008; SUN *et al.*, 2018).

A biogênese dos miRNAs começa a partir de um transcrito primário, o pri-miRNA. Esse pri-miRNA é clivado, no núcleo, pela enzima Drosha, um microprocessador que quebra a molécula em um hairpin, produzindo um precursor o pre-miRNA (HILL e TRAN). Então, o pre-miRNA é transportado para o citoplasma, pela Exportina-5 onde é clivado mais uma vez, agora pela enzima Dicer, gerando um miRNA de dupla fita resultante, que se une a proteína Argonata (AGO). A fita passageira do miRNA é degradada e a fita guia permanece ligada a AGO e forma o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (ZHAO *et al.*, 2022). O complexo RISC interage com a região 3'UTR do mRNA-alvo a partir da complementaridade das bases. Se a complementaridade é total, o mRNA é degradando, já se for parcial, ocorre a inibição da sua tradução (Figura 2) (JORGE *et al.*, 2021).

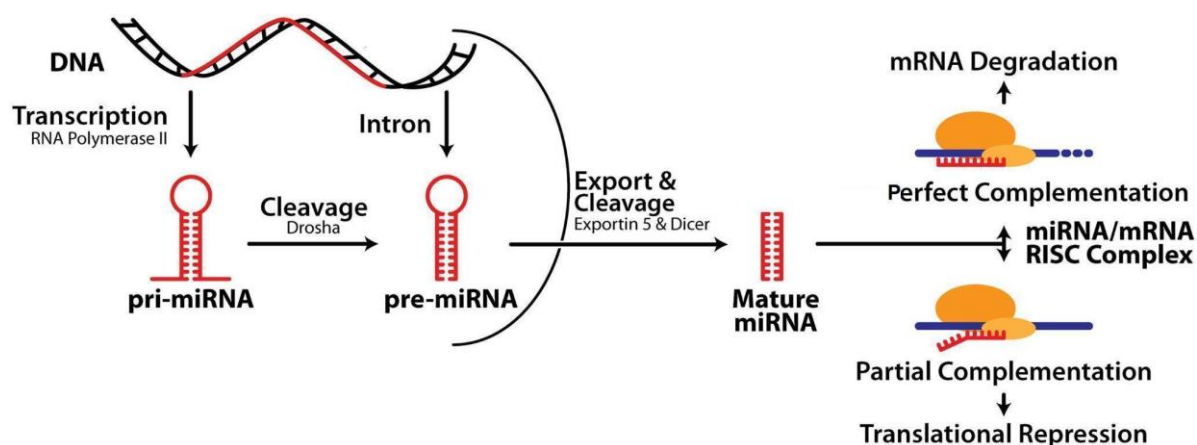


Figura 2 - Biogênese miRNA. Transcrição do pri-miRNA a pela RNA pol II e clivagem pela enzima Drosha em pré-miRNA, no núcleo. Exportação do pré-miRNA para o citoplasma pela Exportina 5 e mais uma vez clivado pela Dicer, criando um miRNA maduro de fita dupla. Uma das fitas-guia se liga à proteína AGO formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC se liga ao RNAm por complementaridade de bases, se for completa ocorre degradação, se a ligação for incompleta há inibição (Adaptado de ANDREASEN, 2018).

Os miRNAs estão presentes desde o início do desenvolvimento do SNC e têm um papel importante no seu desenvolvimento normal. Eles participam da regulação

do desenvolvimento embrionário, proliferação celular, migração, neurogênese adulta e estímulos externos (ARZHANOV; SINTAKOVA, 2022.). Apresentam também uma dinâmica de expressão durante o desenvolvimento e no cérebro adulto. Após a lesão axonal, no SNC, uma vasta gama de microRNAs são modulados, sugerindo que eles possam estar ligados a processos neurodegenerativos e que possam ser alvos terapêuticos (UYEDA e MURAMATSU, 2020). Nesse estudo foi investigado o papel do cluster de miRNA-17~92 no crescimento e regeneração de neuritos/axônios, pois este miRNA está envolvido no controle de diferentes processos biológicos como neurogênese, sobrevivência e diferenciação celular

1.5 Cluster MiR-17~92

O cluster miR-17~92 é um dos conjuntos de miRNA mais conhecidos e que exerce um papel importante no desenvolvimento normal do organismo, e sua desregulação pode estar ligada a alguns problemas como câncer, doenças neurodegenerativas e imunes (PAN *et al.*, 2022). O cluster contém um promotor policistrônico que codifica a seguinte família de genes de miRNAs maduros: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92a (KUO; WU; YANG, 2019). Esse cluster foi identificado em 2004 no cromossomo 13, em células de pacientes com linfoma maligno (FANG *et al.*, 2017). Os clusters são transcritos que resultam da duplicação do genoma e foram agrupados devido a sua homologia sequência. Existem dois conjuntos que são parálogos ao miR-17~92, que são os clusters miR-106a-363 e miR-106b-25 (Figura 3). Os três aglomerados foram agrupados por homologia de sequência sementes, em quatro famílias miR-17, miR-18, miR-19 e miR-92, com alta similaridade e tendo funções sobrepostas (FANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). O transcrito miR-17~92 em questão está ligado ao crescimento e diferenciação celular, proliferação e morte celular, oncogênese, neurogênese e modulação do sistema imunológico (GU; LIU; ZHOU, 2017; PAN *et al.*, 2022; XIN *et al.*, 2017).

miR-17 family	hsa-miR-17-5p	CAAAGUGC	UUACAGUGCAGGUAGU
	hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGC	UUUAUAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGC	CUCAUAGUGCAGGUA
	hsa-miR-106a-5p	CAAAGUGC	CUAACAGUGCAGGUA
	hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGC	CUGACAGUGCAGAU
	hsa-miR-93-5p	CAAAGUGC	CUGUCCGUGCAGGUAG
miR-18 family	hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGC	CAUCUAGUGCAGUA
	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGC	CAUCUAGUGCAGUA
miR-19 family	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAA	AUCUAUGCAAACUGA
	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAA	AUCCAUGCAAACUGA
	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAA	AUCCAUGCAAACUGA
miR-92 family	hsa-miR-92a-3p	UAUUGCAC	UUUGUCCCGCCUG
	hsa-miR-92a-3p	UAUUGCAC	UUUGUCCCGCCUG
	hsa-miR-25-3p	CAUUGCAC	UUUGUCUGGUCUGA
	hsa-miR-363-3p	AUUGCAC	CGGUAUCCAUCUGUA

Figura 3 - Conjuntos Homólogos. Cluster miR-17~92 (negrito) e seus parálogos miR-106a/363 e miR-106b/25. Os miRNAs foram divididos em homologias de acordo com a sequência semente (marcado em azul) (Adaptado de MOGILYANSKY e RIGOUTSOS, 2013).

Os principais alvos do cluster miR-17~92 estão envolvidos na proliferação e crescimento celular, como o fator de transcrição E2 e o receptor II de TGF- β , em morte celular, como o PTEN e BCL2L11 e fatores de angiogênese como o CTGF (MOGILYANSKY, e RIGOUTSOS, 2013). Porém, um dos genes-alvo mais importante regulado pelo cluster é PTEN, um inibidor de crescimento axonal e indutor de apoptose (LIU *et al.*, 2019.). Quando há uma regulação negativa dos níveis de PTEN, ocorre o aumento indireto da atividade da via de mTOR, uma via com um papel regulador de fatores de crescimento e apoptose em resposta ao estresse (LIU *et al.*, 2019).

Já foi demonstrado que a superexpressão do cluster miR-17~92 além de promover a reestruturação dos axônios, também inibe a apoptose em neurônios motores periféricos (ZHANG *et al.*, 2013.), o que o torna um possível alvo terapêutico para distúrbios neurodegenerativos baseados em terapia gênica. Para que essa e outras terapias gênicas funcionem, é necessário a entrega eficiente do material genético nas células desejadas sem provocar respostas imunes interferentes. Neste sentido, os vetores de vírus adeno-associados (AAV) são ferramentas interessantes, pois são sistemas eficazes que protegem o miRNA de degradação e otimizam a entrega em células-alvo (; FUZIWARA e KIMURA, 2015; YANG *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2019; KUO; WU; YANG, 2019; PAUNOVSKA; LOUGHREY; DAHLMAN, 2022)

1.6 Modulação genética por vetores de vírus adeno-associados (AAV)

As terapias gênicas se baseiam na modulação genética para expressar genes específicos que alteram a função celular, através de métodos seguros e eficientes

para a entrega em células-alvo. E esse método é via vetores que podem ser virais, que são usados neste estudo e os não virais. Os vetores virais atuais, são baseados em adenovírus, AAVs e retrovírus (BULCHA *et al.*, 2021). Os AAVs são os tipos de vírus mais utilizados nas terapias gênicas por sua baixa patogenicidade, não integração ao genoma, baixa resposta imune e eficiência na transdução à longo prazo (BUCHER *et al.*, 2021). Essas características o tornam um alvo potencial para as terapias gênicas, já que eles podem ser usados para correção de fenótipos devido à mutação genética e os que não são causados por mutações (RUITENBERG *et al.*, 2002)

O AAV do tipo selvagem (wtAAV) é um vírus com DNA de fita simples com comprimento de 4,7 kb de comprimento (MANDEL *et al.*), envelopado com cerca de 25 nm de diâmetro (NASO *et al.*, 2017) e é membro do gênero *Dependoparvovirus* e da família *Parvoviridae*. Esse vírus é dependente de outros vírus para se replicar, não possuindo todos os genes necessários para isso (FAJARDO-SERRANO *et al.*, 2022). Seu genoma abriga três estruturas de leitura aberta: a primeira, o gene de replicação (rep), a segunda é o gene do capsídeo e a terceira são RNAs mensageiros que são proteínas acessórias associadas (aap) a montagem do capsídeo. Esse genoma é flanqueado pelas regiões de repetições terminais invertidas (ITR) que são importantes para a replicação e o empacotamento do genoma (NASO *et al.*, 2017). Os vírus recombinantes são gerados a partir da substituição dos genes rep, cap e app dos vírus selvagem, por sequências de DNA de interesse, como promotores, genes e outras sequências regulatórias flanqueados pelo ITR (ELANGKOVAN; DICKSON, 2021). Existem 12 sorotipos conhecidos de AAV que possuem tropismo celular no organismo e as variações de AAVs recombinantes podem ser construídas a partir da troca de capsídeo viral (CHEN; KEISER; DAVIDSON). O AAV mais utilizado é o sorotipo 2 (AAV-2) no contexto de doenças neurodegenerativas (CHEN; HU; JU, 2020). A transdução viral acontece pela endocitose, através da ligação do vírus com proteínas transmembranas que o englobam e formam vesículas endossomais, que são mediadas por clatrina. O capsídeo viral vai para o núcleo, libera o material genético e produz uma fita dupla em seu genoma para que ocorra a formação do DNA episossomal (CHEN; KEISER; DAVIDSON).

O uso de vetores virais na terapia gênica é promissor e tem mostrado resultados relevantes no tratamento de doenças. Recentemente, avanços no campo

da terapia gênica já permitem o uso de medicamentos à base de AAV para o tratamento de doenças específicas. Dois medicamentos já foram aprovados para o uso em distúrbios neurodegenerativos monogênicos. O Luxturna compreende um vetor de AAV sorotipo 2 para expressar o gene RPE-65 e trata a Amaurose Congênita de Leber, que é uma distrofia de retina hereditária causada pela deficiência de RPE-65 (KEELER; FLOTTE, 2019). Outro medicamento baseado em AAV é o Zolgensma, que compreende um AAV sorotipo 9 expressando o gene SMN e é usado para tratar a atrofia muscular espinal, uma doença extremamente grave que causa a morte de neurônios motores, levando à perda da contração muscular e à morte precoce nas suas formas mais graves (OGBONMIDE, *et al.*, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a perda de função neuronal em distúrbios neurodegenerativos do SNC, se faz necessário buscar novos métodos terapêuticos que tenham como objetivo interromper a degeneração dos axônios e corpos celulares de neurônios, princípio da neuroproteção, e estabelecer a regeneração. Uma ferramenta promissora para promover regeneração é a terapia gênica, através do uso de vetores de AAV para expressar moléculas capazes de controlar a expressão gênica, como os miRNAs. Os miRNAs modulam a expressão gênica, diminuindo a expressão dos genes alvos, mas também são capazes de aumentar a expressão gênica ou vias de sinalização de maneira indireta. O cluster miR-17~92 é uma família de micRNAs que tem papel na proliferação e crescimento celular, neurogênese e morte celular, sendo um interessante candidato para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos. No entanto, seu papel na neuroproteção e regeneração no SNC ainda não é completamente conhecido.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Testar, a partir de experimentos *in vitro*, se a superexpressão do cluster miR-17~92, utilizando vetores de AAV, é capaz de modular a resposta de crescimento e regeneração de neuritos e axônios de neurônios corticais.

3.2 Específicos

- 1) Investigar se a superexpressão do cluster miR-17~92 em neurônios corticais primários 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,
 - d) promover a regeneração especificamente de axônios após uma lesão.
- 2) Identificar os prováveis genes alvos do cluster miR-17~92 e investigar seus papéis relacionados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados sob as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) através do protocolo 237/2018. Foram utilizados ratos Wistar com 18 dias embrionários. As ratas prenhas foram mantidas no biotério do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em caixas de polipropileno e grades de proteção. Estiveram em ciclo circadiano induzido por períodos claros e escuros de 12 horas cada, a uma temperatura média de 23 graus Celsius e com dieta controlada pela fabricante Nuvilab. A eutanásia das ratas prenhas foi feita por CO₂ com liberação progressiva de gás, sem ultrapassar o limiar alérgico de toxicidade cardiopulmonar, induzindo inconsciência e morte por asfixia.

4.2 Vetores de Vírus Adeno-Associados (AAV) recombinantes

Os vetores utilizados neste trabalho foram produzidos em colaboração com o professor Uwe Michel, da Universidade de Medicina de Göttingen, na Alemanha. Foi usado o vetor controle AAV.CTRL e o vetor experimental AAV.miR-17~92. Ambos os vetores tinham suas sequências flanqueadas pelo ITR, um promotor de sinapsina humana (hSyn), que permite a expressão do transgene apenas em neurônios, controlando o gene repórter mCherry, que serviu para identificar as células traduzidas. No vetor controle (AAV.CTRL), além das sequências citadas, havia outro promotor hSyn e um intrón. O vetor experimental (AAV.miR-17~92) havia um segundo promotor hSyn controlando a expressão do cluster miR-17~92 (Figura 4). Os vetores AAV são produzidos por co-transfecção, em células HEK 293 aderentes

(human embrionic kidney) e são purificados por ultracentrifugação em gradiente de densidade de Iodixanol, seguido, de cromatografia de troca iônica. Esse método de purificação produz estoques de vírus com 99% de pureza e com título entre 10^{12} e 10^{13} partículas virais por mL. As partículas de AAV são quantificadas através de PCR quantitativo.

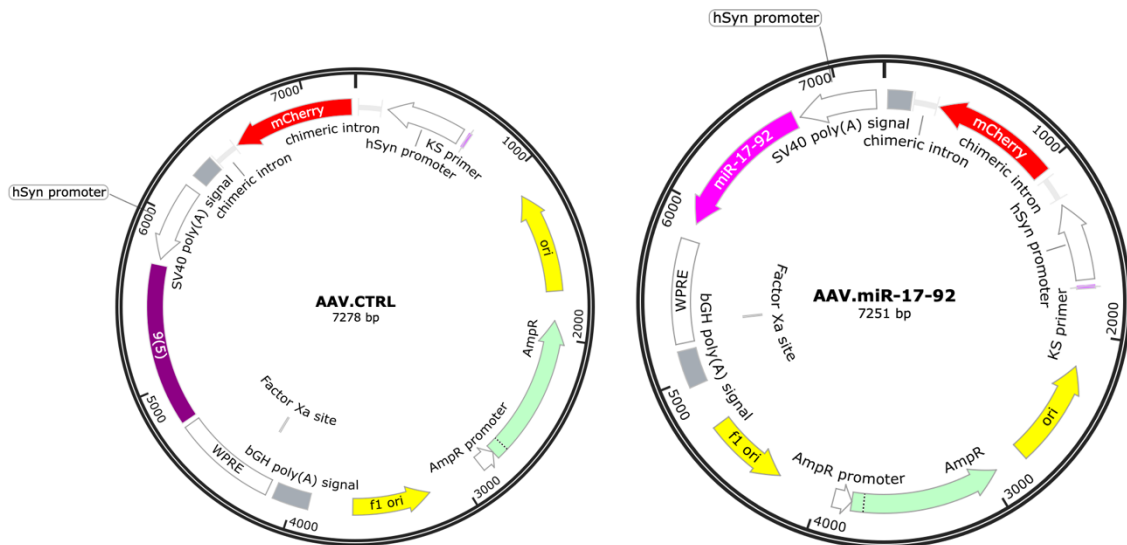


Figura 4 - Mapa dos vetores Virais. Vetor controle (AAV.CTRL), à esquerda, com 2 regiões ITR nas extremidades, um promotor de sinapsina humana (hSyn) controlando o gene repórter mCherry e outro promotor hSyn que não leva a expressão de nenhum gene. No vetor experimental (AAV.miR-17~92), à direita, apresenta as 2 regiões ITR nas extremidades, um promotor de hSyn para o gene repórter mCherry e outro para o cluster miR-17~92. Mapas gerados pelo programa SnapGene.

4.3 Cultura primária de neurônios corticais

Para a cultura primária de neurônios corticais foram usadas ratas prenhas com 18 dias de gestação. Os embriões foram retirados e em seguida o encéfalo e por fim o córtex foi dissecado. O material dissecado foi dissociado com tripsina por 15 minutos a 37°C e depois centrifugados a 800 rpm por 2 minutos a uma temperatura de 4°C . Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em soro fetal bovino 5%. Em seguida, foi feita uma dissociação mecânica com pipeta pasteur. Depois de segunda centrifugação de 1 minuto o sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo os neurônios, foi ressuspensado em meio de cultura Neurobasal suplementado com B-27, Glutamax e Penicilina/Estreptomicina/Neomicina (PSN). Em seguida, foi feita a contagem das células na câmara de Neubauer para o cálculo do plaqueamento das células.

Para o preparo das placas e câmaras microfluídicas foram usadas lamínulas de vidro esterilizadas e tratadas com os seguintes substratos: Poli-L-Ornitina (PLO) e Laminina, para placa de 24 e 96 poços e com Poli-D-Lisina (PDL), para as câmaras

microfluídicas. Nas placas de 24 poços, as células foram plaqueadas com uma densidade de 20, 40 e 150 mil células por poço, para a análise de complexidade de arborização, crescimento e regeneração dos neuritos, respectivamente. Na placa de 96 poços as células foram plaqueadas com uma densidade de 40 mil células por poço. Já nas câmaras microfluídicas, a densidade usada foi de 400 mil células dentro do compartimento somático. Para a manutenção das células, metade do meio de cultura foi trocado a cada dois dias até o final do experimento.

4.4 Teste de eficácia de transdução viral

Para avaliar a eficácia da transdução viral, foi realizado um teste em que os neurônios corticais primários foram plaqueados em uma densidade de 250 mil células por poço em placas de 24 poços e transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-17~92 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 mCherry, em um microscópio de fluorescência Axiovert, da Zeiss. Essa análise mostrou que o melhor título viral foi de 1×10^7 , no caso de vetor AAV.CTRL e 2×10^7 , no caso do vetor AAV.miR-17~92, partículas virais por poço. Portanto, em todos os experimentos seguintes em placas de 24 poços ou câmara microfluídica foram usadas essas titulações virais. Nas placas de 96 poços a titulação usada foi de 7×10^6 no caso de vetor AAV.CTRL e 1×10^7 no caso do vetor AAV.miR-17~92, partículas virais por poço, que foi calculada baseada na área do poço e densidade celular. Em todos os experimentos os neurônios eram checados todos os dias para análise da expressão de mCherry por microscopia de fluorescência, usando o microscópio invertido Axiovert, da Zeiss. Com esses títulos virais foi possível atingir em torno de 90% de taxa de transdução dos neurônios.

4.5 Ensaio de viabilidade celular

Para analisar a viabilidade celular foi usado o ensaio de MTT, onde os neurônios foram plaqueados em placas de 96 poços e com uma densidade celular de 40 mil células por poço. Após 4 horas do plaqueamento os neurônios foram transduzidos com os vetores AAV.CTRL (1×10^7) e AAV.miR-17~92 (7×10^6). No sétimo dia in vitro foi realizado o ensaio de MTT. Este ensaio consiste em um sal de tetrazólio (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para medir a atividade metabólica das células. O ensaio foi baseado na redução desse sal em cristais de formazan de coloração roxa em células metabolicamente ativas. A

solução corada foi medida por um espectrofotômetro e quanto maior o número de células ativas mais escura era a solução. Inicialmente foi feita diluição de meio novo e MTT e reservado. O meio antigo é retirado, em seguida a solução preparada foi pipetada nos poços e aguardado 2 horas. Após esse tempo o MTT é descartado, lavado uma vez com PBS 1x e colocado Isopropanol na placa para ressuspensão dos cristais. As amostras são transferidas para uma placa de Elisa para leitura no espectrofotômetro a 595 nm.

4.6 Imunocitoquímica

Para realizar as análises de crescimento, complexidade e regeneração de neuritos após lesão, ao final do experimento, a cultura em placa de 24 poços foi fixada com paraformaldeído 4% (PFA 4%) em tampão fosfato salina (PBS). Em seguida, após lavagem com PBS, foi colocado uma solução de Triton 0,5% em PBS, para promover a permeabilização das células, por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi colocado solução de bloqueio com Albumina de Soro Bovino (BSA) 5% em PBS, por 1h. Após esses passos a lamínula contendo as células foi incubada com o anticorpo primário Tuj1 (Biolegend, #801201), que detecta β -III-tubulina, um marcador de citoesqueleto específico de neurônios, a 4°C, *overnight*. No dia seguinte foram feitas três lavagens com PBS e incubado com o anticorpo secundário, conjugado com AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Scientific), por 1h a temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas são lavadas novamente em PBS, incubadas com o marcador nuclear DAPI e montadas com o meio de montagem Fluoromount. As lâminas foram guardadas a 4°C até a realização das imagens de microscopia de fluorescência.

4.7 Crescimento de neuritos

Para o experimento de crescimento de neuritos foram plaqueadas 40 mil células por poço (placa de 24 poços). Após a transdução com os vetores e 8 dias de cultura, as células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpo Tuj1. As imagens foram geradas pelo microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) com uma objetiva de 20x e processadas pelo programa ImageJ. A quantificação do crescimento dos neuritos foi feita a partir da área ocupada pela marcação de Tuj1 normalizada pelo número de células em cada imagem, observando as diferenças entre o grupo controle e o experimental

4.8 Complexidade da arborização dos neuritos

A análise de arborização neurítica foi feita com um mesmo curso temporal descrito acima, mas com uma densidade de 20 mil células por poço (placa de 24 poços), para que houvesse neurônios isolados. As imagens foram geradas pelo microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss) com uma objetiva de 40x e processadas pelo programa ImageJ. A quantificação da arborização dos neuritos foi feita através da análise de Sholl, onde foi feita uma marcação no centro do corpo celular do neurônio e, em seguida, foram feitos círculos concêntricos iniciando em 5 μm da marcação com intervalos de 2 μm até um máximo de 51 μm para marcação de intersecções entre os círculos e os neuritos. Essa análise permite avaliar a arborização dos neuritos em neurônios individuais.

4.9 Regeneração de neuritos

Para a avaliar a regeneração de neuritos, foi usada uma concentração de 150 mil células por poço (placa de 24 poços). Após a transdução com os vetores e 7 dias de cultura foi feita uma lesão nas células (tipo *scratch*), com uma ponteira, de forma perpendicular de uma borda até a outra do poço. Esperou-se 24h, para que os neuritos pudessem regenerar, e, em seguida, as células foram fixadas em PFA 4% e foi feita a imunofluorescência para Tuj1. As imagens foram feitas de duas formas: imagem da área da lesão, contendo os neuritos em regeneração, e da região onde estavam localizadas as células adjacentes à lesão, que regeneram os prolongamentos. As imagens foram feitas pelo microscópio ApoTome (Zeiss) e processadas pelo programa ImageJ. A quantificação foi feita com o plugin NeuronJ de duas formas: na primeira, foi delimitada uma área no local da lesão entre 100 μm e 200 μm da borda da lesão e o tamanho total dos neuritos nesta região foi quantificado. Na segunda análise, foi quantificado o número de neuritos que ultrapassaram uma linha a uma distância de 200 μm da borda da lesão. Em ambos os casos, os valores foram normalizados pelo número de células presentes a uma distância de 100 μm da borda da lesão na área onde estavam localizadas as células adjacentes a lesão e também normalizados pelo controle.

4.10 Regeneração de axônios

Para a análise de regeneração especificamente de axônios, as células foram plaqueadas em uma câmara microfluídica (Figura 5), que permite a separação do corpo celular e dos axônios. A câmara microfluídica é constituída de um compartimento somático, onde as células são plaqueadas, um compartimento

axonal, que conterá apenas axônios e, na parte central, os microcanais que permitirão a passagem dos axônios para o compartimento axonal. A cultura nas câmaras microfluídicas foi feita com uma densidade de 400 mil células que são injetadas diretamente no compartimento somático. Após um dia do plaqueamento os neurônios são transduzidos com os vetores de AAV e a cada dois o meio de cultura foi trocado e as células observadas. Entre sete e nove dias de cultura, tempo necessário para os axônios cruzarem os microcanais, foi feita uma lesão através de sucção do meio do compartimento axonal, rompendo assim os axônios que tinham atravessado os microcanais. Após esse processo foi esperado 48h para que houvesse a regeneração axonal. As imagens das câmaras microfluídicas foram feitas por microscopia de fluorescência observando a expressão de mCherry nos axônios de neurônios vivos usando o microscópio ApoTome (Zeiss). Para quantificar a regeneração axonal, foi feita uma contagem, manual, dos axônios que regeneraram e que cruzaram as marcações a uma distância de 100, 200, 500 e 1000 μm após a saída dos microcanais no compartimento axonal.

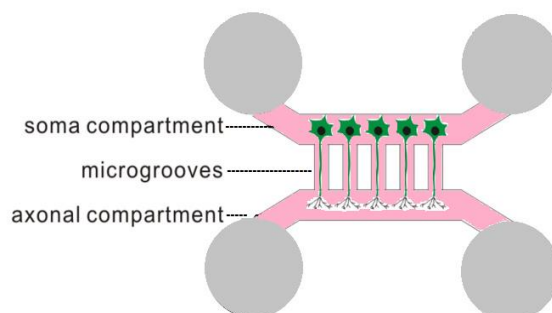


Figura 5 - Câmara microfluídica Esquema mostrando o desenho de uma câmara microfluídica, que é constituída de um compartimento somático (soma compartment), onde são plaqueados os neurônios e estão contidos os corpos neuronais, dendritos e axônios, um compartimento axonal (axonal compartment), que apresenta apenas axônios e os microcanais (microgrooves), entre os compartimentos somático e axonal, por onde atravessam os axônios.

4.11 Bioinformática

Para avaliar os possíveis alvos do cluster miR-17~92 foi realizada uma busca dos genes alvos dos miRNA no banco de dados miRWalk, que tinham sido validados pelas plataformas TargetScan, miRDB, miRTarBase. Os genes alvos do cluster miR-17~92 foram procurados baseados nos miRNAs do cluster, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-92a-3p. Os dados foram filtrados para um score de 1 e região 3'UTR. A lista de genes alvos

validados para os miRNAs foi exportada para a plataforma g:Profiler onde as análises de ontologia gênica foram realizadas.

4.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 9. Para as análises de crescimento e regeneração de neuritos os valores foram normalizados pelo controle (100%) e foi usado o teste t de uma amostra. No experimento de viabilidade celular foi usado o teste t não pareado. No experimento de complexidade da arborização neurítica foi utilizado o teste 2-way ANOVA e pós teste de Sidak para comparações múltiplas. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. Os valores eram significativos para o valor $P < 005$.

5. RESULTADOS

5.1 Eficácia da transdução e análise de citotoxicidade dos vetores de AAV

A análise de eficiência de transdução viral foi feita com a finalidade de verificar se os vetores estavam cumprindo seu papel de infectar as células e expressar o transgene de interesse. Para isso, placas de 24 poços foram, previamente, tratadas com PLO e Laminina. A cultura foi preparada e os neurônios foram plaqueados a uma densidade de 250 mil células/poço. Após 4 horas de plaqueamento, foram adicionados aos poços os vetores AAV.miR-17~92 e AAV.CTRL em diferentes titulações. Passados oito dias, imagens de contraste de fase e da expressão de mCherry foram feitas pelo microscópio de fluorescência Axiovert (Zeiss) (Figura 6A).

Foi visto que nos títulos virais de 1×10^7 para o vetor AAV.CTRL e de 2×10^7 para o vetor AAV.miR-17~92 foi possível obter uma eficiência de transdução de aproximadamente 80% para ambos os vetores, sem sinais de citotoxicidade (Figura 6B). Para confirmar que os vetores não causavam citotoxicidade diferencial foi feito um teste de viabilidade celular. O experimento foi realizado através de cultura em placa de 96 poços que foi transduzida com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-17~92 e aguardado sete dias. Após esse período, foi realizado o ensaio de viabilidade celular de MTT. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa de viabilidade celular quando comparado os dois vetores (Figura 6C). Esses dados confirmam que ambos os vetores são eficientes em transduzir neurônios corticais

primários sem causar citotoxicidade diferencial entre eles.

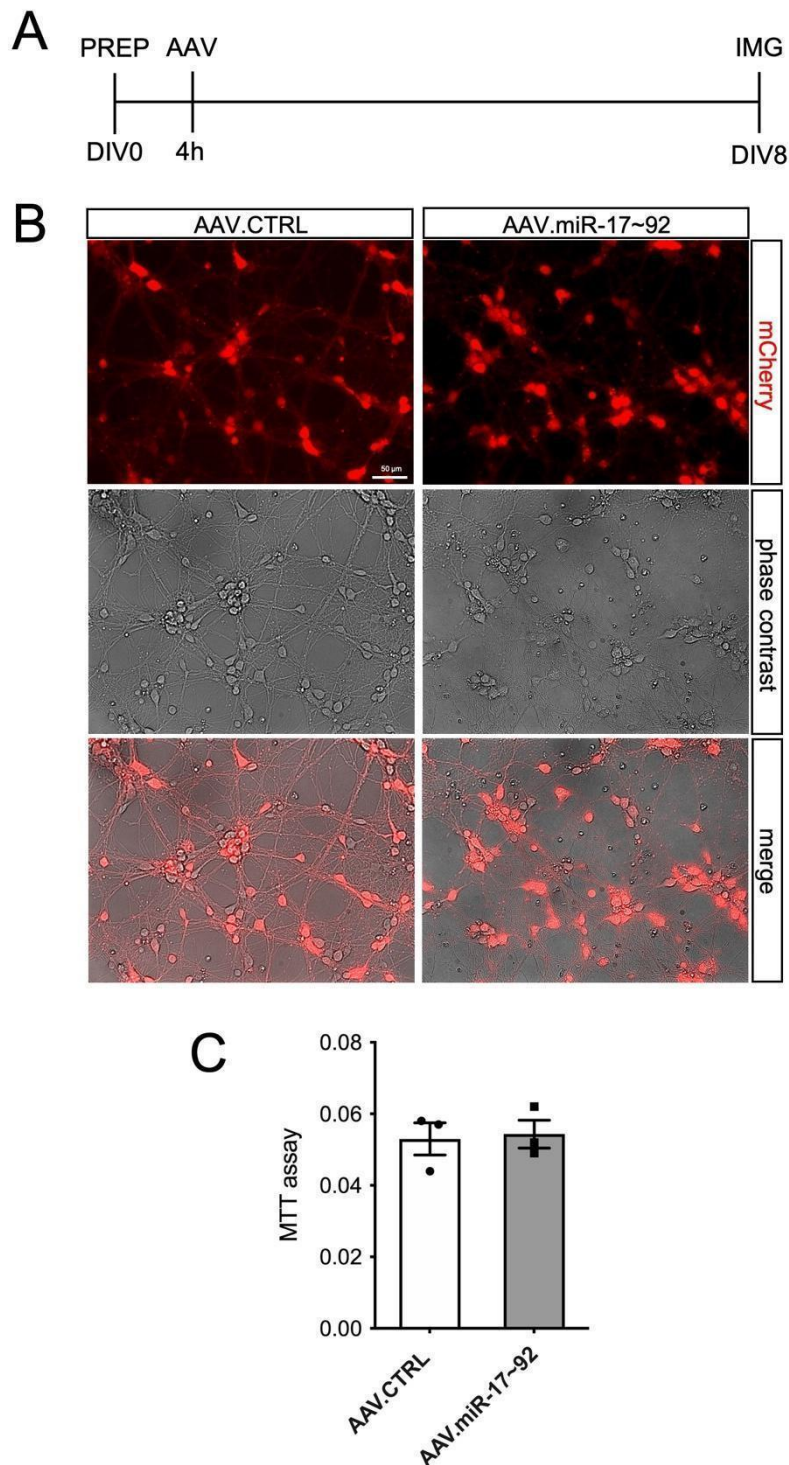


Figura 6 - Efetividade e citotoxicidade dos vetores de AAV. A. Desenho experimental. Dia 0 é feita a cultura (PREP) e após 4 horas os neurônios são transduzidos com os vetores (AAV). Oito dias após a cultura é fixada e a expressão de mCherry é avaliada em um microscópio de fluorescência (IMG) para avaliar a capacidade dos vetores de AAV de transduzir os neurônios. B. Imagens representativas dos neurônios transduzidos com os vetores AAV CTRL e AAV-miR-17~92, mostrando a expressão de mCherry (vermelho), todas as células no contraste de fase (cinza) e a sobreposição das imagens (merge). Barra de escala: 50 μ m C. Gráfico do ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT. (n=3 culturas independentes). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média; não significativo de acordo com teste-t não pareado.

5.2 Superexpressão do cluster miR-17~92 aumenta o crescimento neurítico

As análises de crescimento neurítico foram realizadas a fim de verificar se a superexpressão do cluster de miR-17~92 é capaz de aumentar o crescimento de neuritos em relação ao controle. Para este experimento, os neurônios foram plaqueados em placas de 24 poços a uma densidade de 40 mil células/poço. Após 4 horas do plaqueamento, foram adicionados aos poços os vetores AAV.miR-17~92 e AAV.CTRL. O plaqueamento e a transdução viral foram feitos em duplicata. Passados oito dias a placa foi fixada e feita imunocitoquímica com anticorpo Tuj1, que marca β -III-Tubulina, de microtúbulos neuronais. As imagens foram feitas pelo microscópio de fluorescência ApoTome da Zeiss (Figura 7A).

Foi visto que no grupo com transdução com o AAV.miR-17~92 os neurônios possuíam neuritos maiores quando comparado com o vetor controle, AAV.CTRL (Figura 7B e C). A quantificação mostrou que houve um aumento significativo de $35\% \pm 13,6$; (n=6; $P < 0.05$) da área ocupada pela marcação de Tuj1 no grupo AAV.miR-17~92 em relação ao grupo AAV.CTRL (Figura 7D). Portanto, os resultados sugerem que o cluster miR-17~92 induz um aumento do crescimento neurítico em neurônios corticais primários.

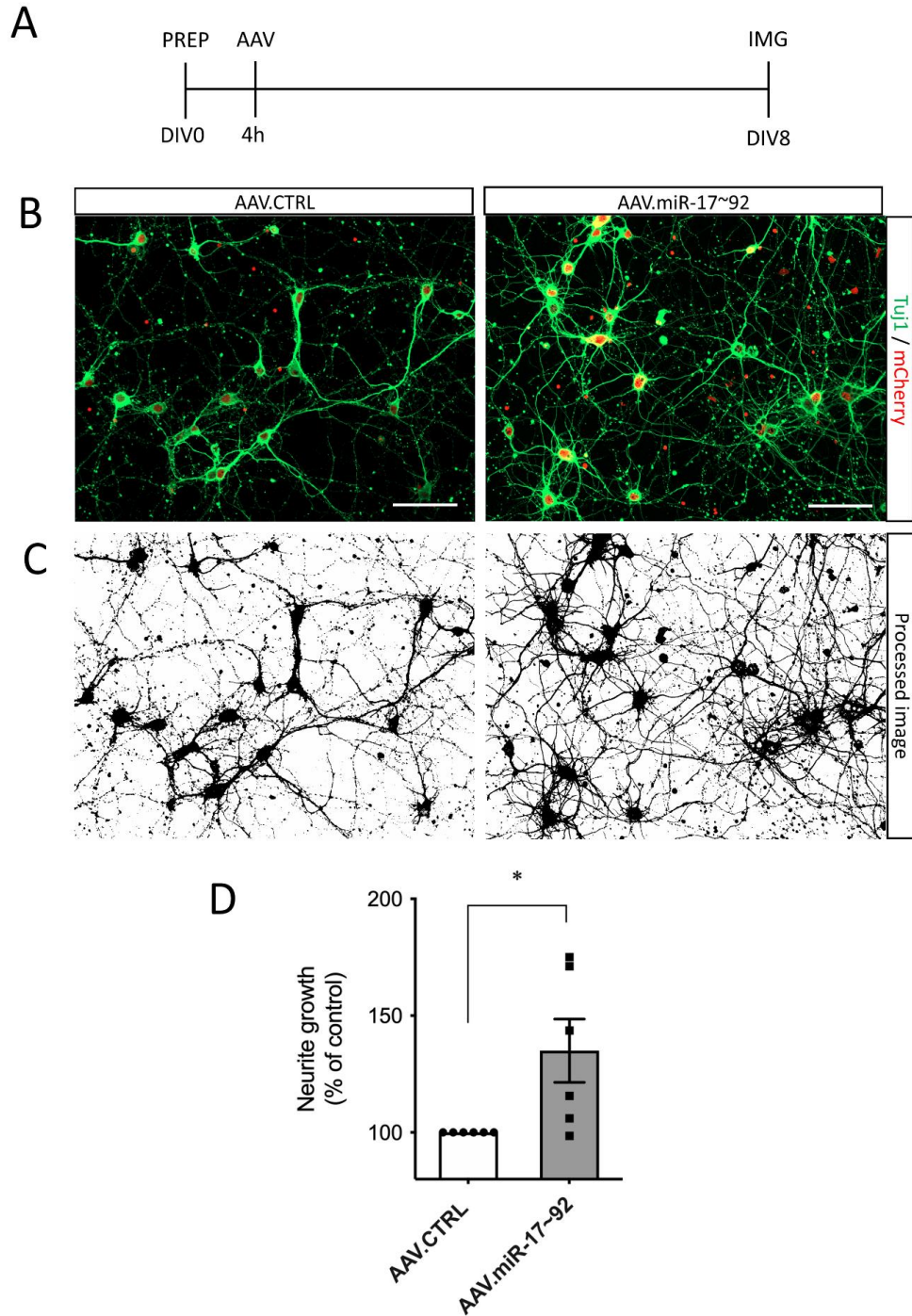


Figura 7 - Avaliação do crescimento neurítico. **A.** Desenho experimental. Dia 0 é feita a cultura (PREP) e após 4 horas os neurônios são transduzidos com os vetores (AAV). Oito dias após a cultura é fixada, feita imunocitoquímica para Tuj1 e imagens em um microscópio de fluorescência (IMG). **B.** Imagens representativas mostrando a marcação Tuj1 (verde) no grupo controle (AAV CTRL) e do grupo experimental (AAV.miR-17~92) e de mCherry (vermelho). Barra de escala: 50 μ m **C.** Imagem processada pelo software ImageJ para cálculo de ocupação de área. **D.** Gráfico de crescimento neurítico baseado na ocupação de área da imagem normalizado pelo número de células, e em % do grupo controle ($n=6$ culturas independentes). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média; * $P < 0.05$ de acordo com teste t de uma amostra.

5.2 Complexidade de arborização neurítica por análise do Sholl

Os testes de complexidade neurítica, através da análise de Sholl, foram feitos para avaliar se o cluster miR-17~92 é capaz de influenciar a arborização de neuritos. Para avaliar a arborização neurítica sob influência do miR-17~92, os neurônios foram plaqueados em uma densidade de 20 mil células/poço (placa de 24 poços), para que houvesse neurônios isolados. Após 4 horas do plaqueamento, as células foram transduzidas com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-17~92 e cultivadas durante oito dias. Ao final desse período a placa foi fixada, foi feita imunocitoquímica para Tuj1 e as imagens foram feitas pelo microscópio de fluorescência ApoTome da Zeiss (Figura 8A).

Os dados na análise de Sholl mostraram que a transdução com vetor AAV.miR-17~92 aumenta a ramificação dos neuritos, quando comparado com o grupo transduzido com o vetor AAV.CTRL (Figura 8B e C). A quantificação da análise de Sholl mostrou que o intervalo dos raios entre 5 a 13 μm não apresentaram diferença significativa em relação às ramificações comparando o grupo AAV.CTRL e o AAV.miR-17~92. No entanto, nas distâncias de 15 μm a 25 μm as ramificações do neuritos foi aumentada pelo AAV.miR-17~92 em comparação com o AAV.CTRL ($n=4$, $P<0.01$ para 15, 23 e 25 μm e $P <0.001$ para 17, 19 e 21 μm) (Figura 8D). Os demais raios de 27 a 51 μm também não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados permitem concluir que a superexpressão do miR-17~92 foi capaz de aumentar a complexidade neurítica em relação ao grupo controle.

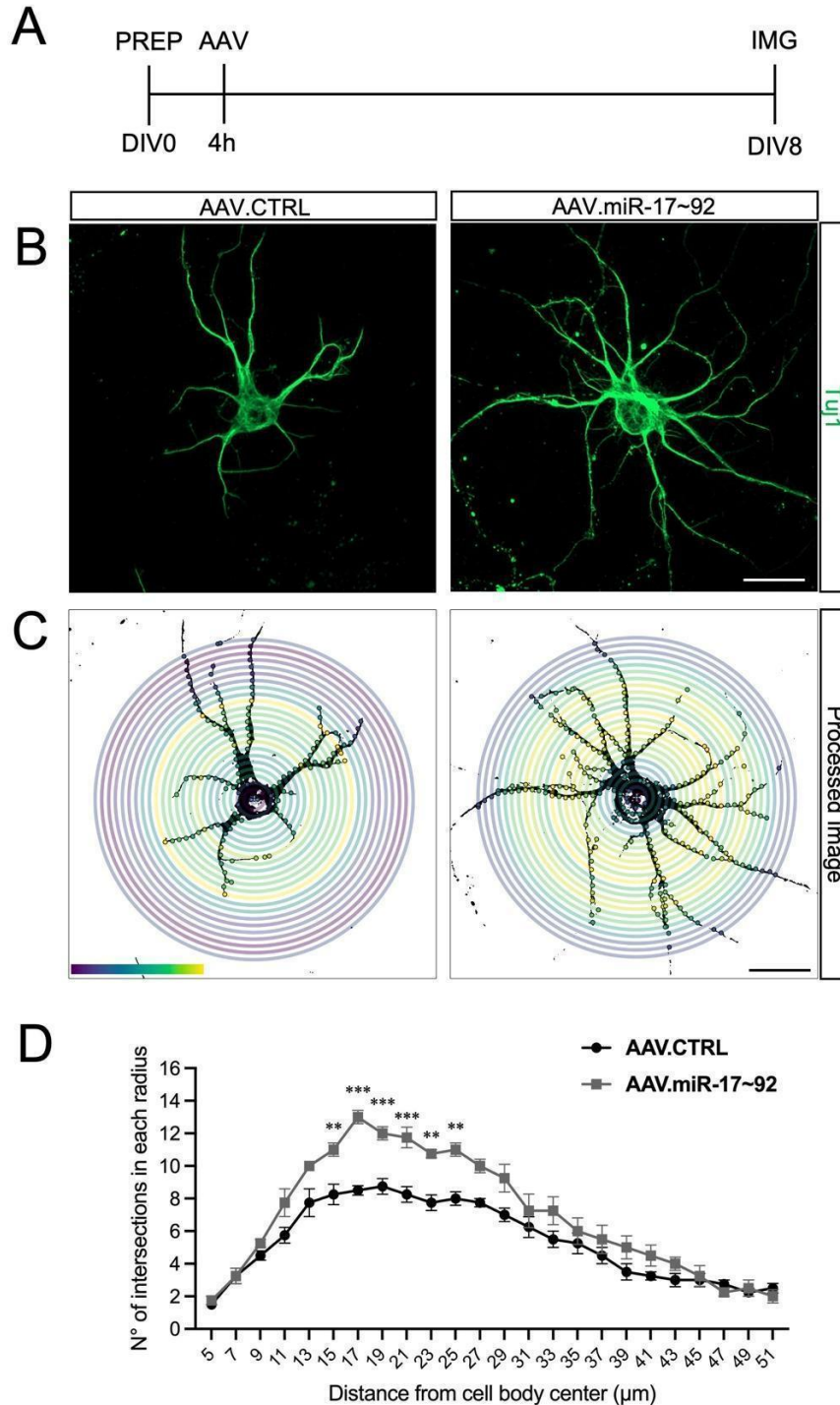


Figura 8 - Análise de Sholl. **A.** Desenho experimental. Dia 0 é feita a cultura (PREP) e após 4 horas os neurônios são transduzidos com os vetores (AAV). Oito dias após a placa é fixada e feita imunocitoquímica para Tuj1 e imagens em um microscópio de fluorescência (IMG). **B.** Imagens representativas mostrando a marcação Tuj1 (verde) no grupo controle (AAV.CTRL) e do grupo experimental (AAV.miR-17~92). Barra de escala: 20 μm **C.** Imagens processadas no software ImageJ para análise de Sholl. Barra de cores indica o número de interseções (maior = amarelo / menor = roxo) **D.** Gráfico mostrando no eixo X as distâncias marcadas pelos raios traçados e no eixo Y o número de interseções em cada raio. Linha com círculos pretos representam o grupo controle (AAV.CTRL) e a linha com quadrados cinza representa o grupo experimental (AAV.miR-17~92). $n=4$ culturas independentes. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ de acordo com 2-way ANOVA e pós-teste Sidak de comparações múltiplas.

5.3 Regeneração neurítica após lesão do tipo *scratch*

Para avaliar a influência do miR-17~92 mais especificamente na regeneração de neuritos de neurônios corticais em cultura, foi realizado um experimento de lesão neuronal. A cultura foi realizada da mesma maneira dos testes anteriores, porém com uma densidade de 150 mil células por poço (placa de 24 poços). Foi adicionado os vetores após 4 horas de cultura e esperado um período de crescimento de sete dias. No sétimo dia, as células são observadas e, então, é feita a lesão do tipo *scratch* (arranhão) para analisar a regeneração neurítica. Após 24 horas, tempo necessário para que os neuritos cresçam novamente, as células foram fixadas e foi feita a imunocitoquímica para Tuj1. As imagens são feitas pelo microscópio ApoTome, Zeiss (Figura 9A).

Para quantificar a regeneração dos neuritos, foram realizadas duas análises. Na primeira, foi quantificado o tamanho total de todos os neuritos presentes a uma distância entre 100 e 200 μm a partir da borda da lesão. Nesta análise, houve uma tendência de aumentos de duas vezes no tamanho dos neuritos no grupo AAV.miR-17~92 em comparação com o AAV.CTRL (Figura 9B e C). No entanto, devido ao baixo n amostral e à grande variabilidade dos dados esse aumento não atingiu significância estatística ($n=4$, $P=0.06$). Na segunda análise foi analisado o número de prolongamentos que cruzavam a linha de 200 μm da borda da lesão proveniente das células abaixo da lesão. Nesta análise, apesar de haver um aumento numérico de aproximadamente quatro vezes, não foi visto nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 9D). Estes dados sugerem que o cluster miR-17~92 pode aumentar a regeneração de neuritos, no entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar esse efeito.

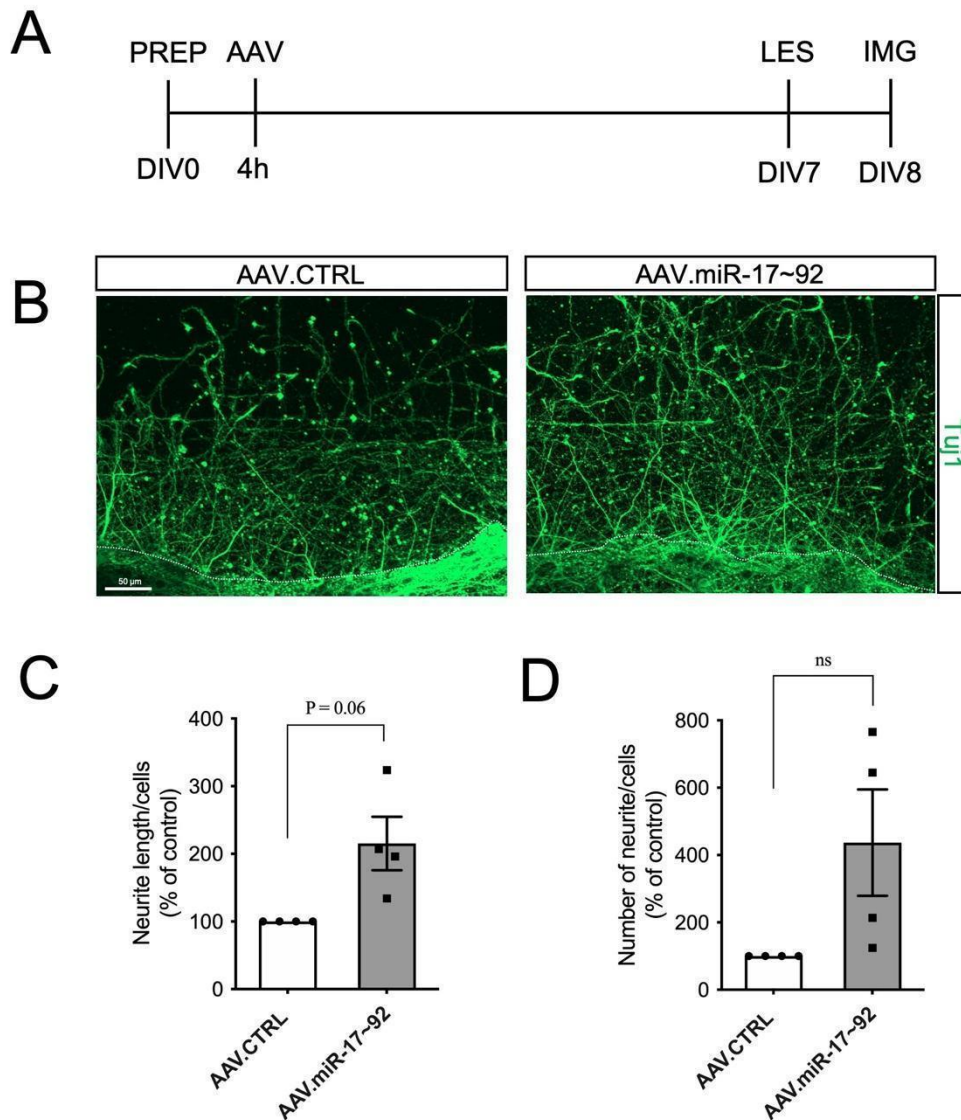


Figura 9 - Regeneração de neuritos após lesão do tipo scratch. **A.** Desenho experimental. Dia 0 é feita a cultura (PREP) e após 4 horas os neurônios são transduzidos com os vetores (AAV). Sete dias após é feita uma lesão tipo scratch (LES), após 24 horas a placa é fixada e é feita imunocitoquímica para Tuj1 e imagens em um microscópio de fluorescência (IMG). **B.** Imagens representativas mostrando a marcação Tuj1 (verde) no grupo controle (AAV CTRL) e do grupo experimental (AAV.miR-17~92) mostrando a área de lesão e a borda da lesão (linha tracejada na parte inferior). Barra de escala: 50 μ m **C.** Gráfico mostrando no eixo Y a medida do tamanho total dos neuritos (entre 100 e 200 μ m da lesão), normalizado pelo número de células (em % do controle) nos grupos transduzidos com os vetores AAV CTRL e AAV.miR-17~92. **D.** Gráfico mostrando no eixo Y o número de neuritos que atingiu a marca de 200 μ m da lesão, normalizado pelo número de células (em % do controle) nos grupos transduzidos com os vetores AAV CTRL e AAV.miR-17~92 (n=4 culturas independentes). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média; P = 0.06; ns = não significativo; de acordo com teste T de uma amostra.

5.4 Análise de regeneração axonal de neurônios plaqueados em câmaras microfluídicas

O experimento anterior analisou a influência do cluster miR-17~92 na regeneração de neuritos como um todo. Com o objetivo de analisar a regeneração especificamente de axônios os neurônios foram plaqueados em câmaras

microfluídicas, que é um modelo no qual permite a separação do corpo neuronal e dendritos dos axônios. Isso se dá através da presença de microcanais que permitirão a passagem somente dos axônios até o compartimento axonal (Figura 5). Os neurônios foram plaqueados e transduzidos com os vetores e após um período de sete a nove dias, tempo necessários para que os axônios cruzassem os microcanais, foi feita uma lesão nos axônios através de sucção do meio de cultura do compartimento axonal. Após a lesão a cultura foi mantida por 48 horas para que os axônios regenerassem e imagens foram feitas em um microscópio de fluorescência (ApoTome) através da expressão de mCherry nas células vivas (Figura 10A).

Neste experimento preliminar ($n = 1$), foi visto que na câmara microfluídica onde os neurônios foram transduzidos com o vetor AAV.miR-17~92 os axônios no compartimento axonal eram maiores e mais numerosos (Figura 10B). As análises quantitativas, com resultados ainda preliminares, mostraram que o número de axônios nas distâncias de 100, 200, 500 e 1000 μm a partir da borda dos microcanais, no sentido do compartimento axonal, foi maior no grupo com transdução com o vetor AAV.miR-17~92 comparado com o grupo AAV.CTRL (Figura 10C). Podemos especular que a superexpressão do cluster miR-17~92 pode ter um efeito positivo na regeneração axonal de neurônios corticais *in vitro*. Porém são dados preliminares e ainda é necessário um número maior de experimentos para confirmar esse efeito regenerativo.

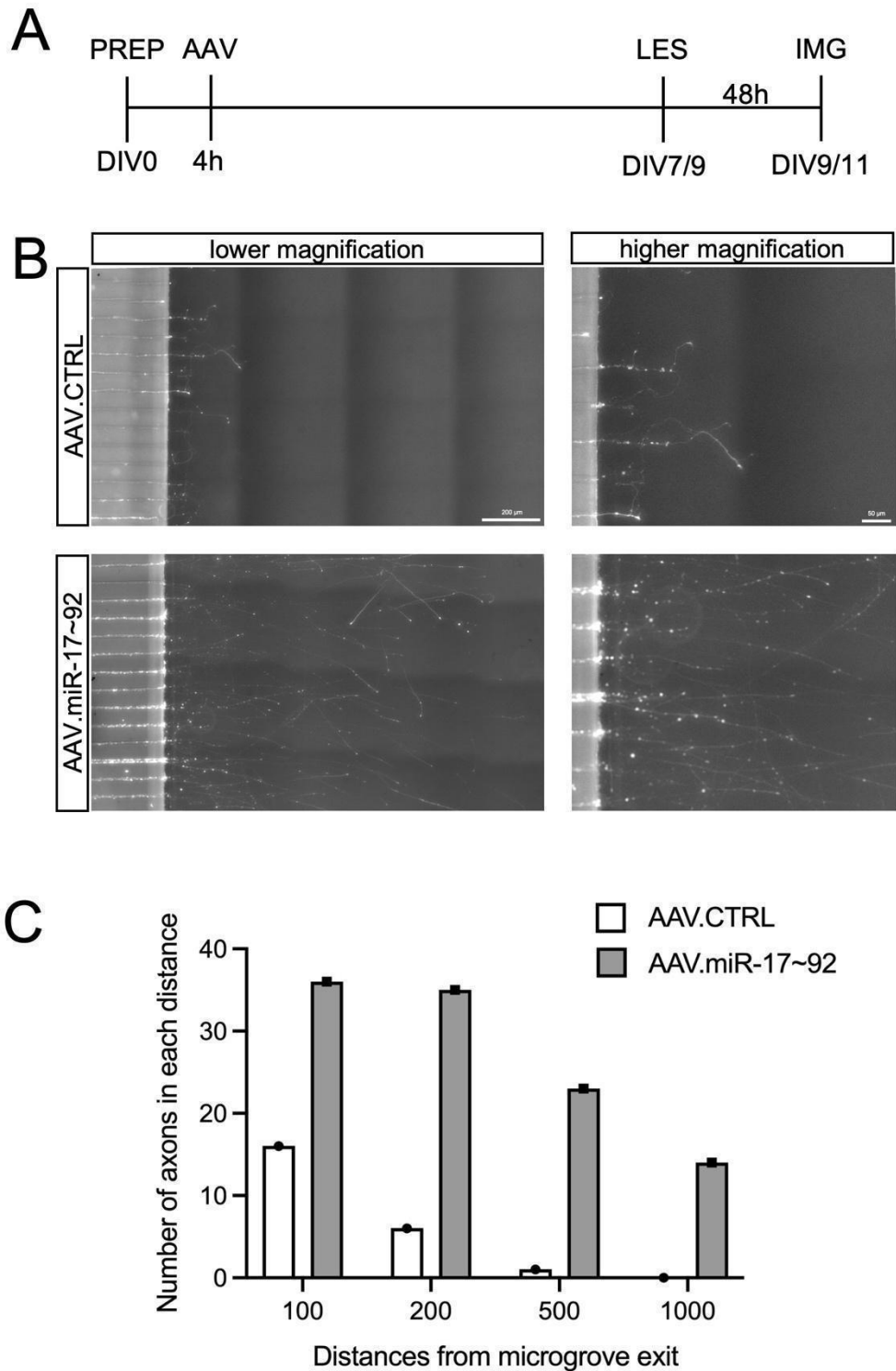


Figura 10 - Regeneração axonal. **A.** Desenho experimental. Dia 0 é feita a cultura (PREP) e após 24 horas os neurônios são transduzidos com os vetores (AAV). De sete a nove dias após é feita uma lesão nos axônios (LES), após 48 horas imagens são feitas em um microscópio de fluorescência (IMG) avaliando a expressão da proteína fluorescente mCherry nos neurônios vivos. **B.** Imagens mostrando os axônios em regeneração no compartimento axonal expressando a proteína fluorescente mCherry (branco) em menor (esquerda) e maior (direita) aumentos. Barra de escala: 200 μm (imagens da esquerda) e 50 μm (imagens da direita). **C.** Gráfico preliminar mostrando no eixo Y o número de axônios que cruzaram a marca de 100, 200, 500 e 1000 μm a partir da saída dos microcanais nos grupos transduzidos com os vetores AAV.CTRL e AAV.miR-17~92.

5.5 Análise de Bioinformática

Para investigar possíveis mecanismos envolvidos no efeito da superexpressão do cluster miR-17~92 sobre o crescimento e regeneração de neuritos foi realizada uma análise de bioinformática para avaliar os mRNAs alvos dos miRNAs que compõem o cluster. A busca dos mRNAs alvos foi feita através da plataforma miRWalk com os miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-92a-3p de alvos validados na base de dados TargetScan, miRDB e miRTarBase. Esta análise identificou 251 mRNA alvos, que foram analisados na plataforma g:Profiler para a obtenção de análises ontológicas dos genes. A busca foi feita nas categorias de Processos Biológicos, Componentes Celulares e Funções Moleculares.

Dentre os processos biológicos mais enriquecidos, podemos destacar: 1) resposta a fator de crescimento; 2) regulação de diferenciação celular; 3) regulação positiva da transcrição modelada por ácido nucléico; 4) regulação positiva do processo biossintético de macromoléculas; 5) neurogênese; 6) resposta celular ao estresse (Figura 11A). Dentre os componentes celulares, podemos destacar: 1) compartimento somatodendrítico; 2) microtúbulos; 3) árvore dendrítica e dendritos; 4) axônio (Figura 11B). Por fim, em função molecular foram enriquecidos apenas: 1) ligação do correpressor de transcrição; 2) ligação de proteína cinase; 3) ligação de cinase (Figura 11C).

Esta análise indica que os mRNAs alvos do cluster miR-17~92 estão envolvidos em diversas funções relacionadas com os efeitos observados e seus produtos gênicos estão localizados em compartimentos celulares relevantes em neurônios.

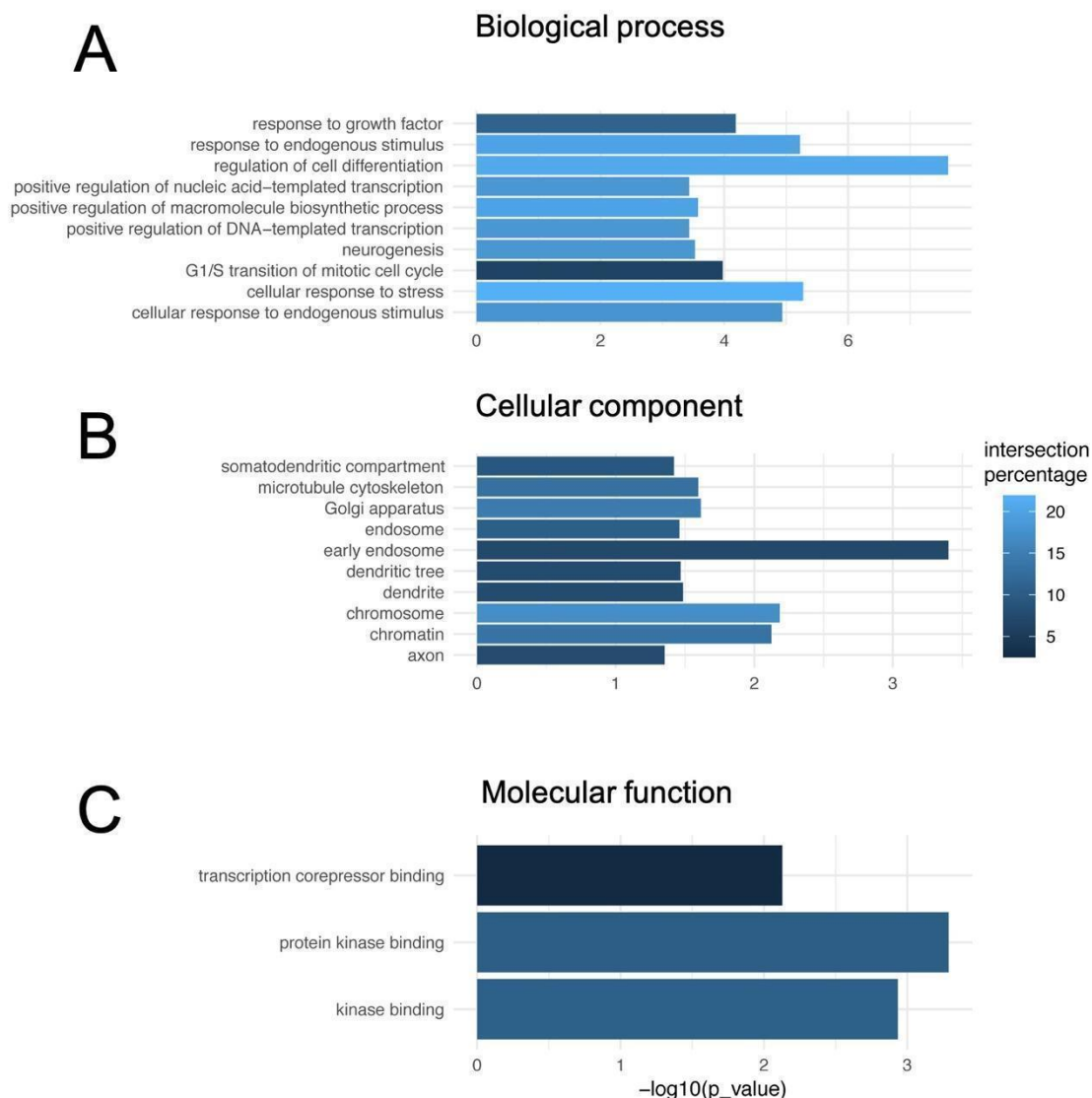


Figura 11 - Análise dos mRNAs alvos do cluster miR-17~92 por ontologia gênica. Gráficos mostrando Processos Biológicos (A), Componentes celulares (B) e Funções moleculares (C) enriquecidas na análise de ontologia gênica dos genes que codificam os mRNAs alvos do cluster miR-17~92. No eixo X, dos gráficos, são mostrados os valores de $-\log_{10}(p_value)$ que demonstra o quanto enriquecidos são os Processos Biológicos, Componentes Celulares e Funções Moleculares mostrados. A barra de cores indica a porcentagem de genes do banco de dados de cada condição presente nas análises de acordo com a legenda.

6. DISCUSSÃO

Neurônios do SNC, em mamíferos adultos, possuem uma baixa capacidade regenerativa. Identificar mecanismos que modulam a regeneração é uma importante estratégia para a restauração funcional do SNC. Neste contexto, os miRNAs são ferramentas promissoras para induzir a regeneração, através de terapias genéticas mediadas por vetores virais. Terapias gênicas neuroprotetoras já são uma realidade para alguns distúrbios neurodegenerativos antes considerados sem cura e em um

futuro próximo espera-se que haverá também tratamentos regenerativos. Estratégias de manipulação gênica irão mudar o manejo clínico dessas doenças, sejam elas hereditárias ou não. Porém, ainda há obstáculos na entrega correta de genes, na segurança e na eficácia dos tratamentos

O presente estudo mostrou que uma terapia gênica regenerativa para a distúrbios neurodegenerativos, através da superexpressão do cluster miR-17~92, foi capaz de promover o crescimento neurítico e aumento da arborização neurítica em níveis significativos em cultura primária de neurônios corticais *in vitro*. Dados preliminares sugerem que a superexpressão do cluster miR-17~92 também pode ser capaz de promover regeneração de neuritos e axônios. Análises de bioinformática identificaram vários genes que participam de vias de sinalização e eventos biológicos, ligados à neurodegeneração e regeneração.

6.1 miRNA-17~92 e o crescimento e a complexidade neurítica

O SNC embrionário foi usado neste estudo com o objetivo de estudar a alta capacidade regenerativa dos neurônios nesta fase. A expressão de genes nesse sistema pode ser favorável ao crescimento axonal e inibitória a vias que regulam negativamente o alongamento axonal (RIBAS; COSTA, 2017). Usar neurônios embrionários é importante, pois são células que já possuem uma capacidade regenerativa intrínseca e melhorar essa atividade pode ser um mecanismo de auxílio para regeneração em neurônios maduros, que não se regeneram devido ao microambiente e ao desbalanço gênico. Entender o papel dos genes pró-regenerativos é estratégico para o desenvolvimento de terapias gênicas para regeneração de neurônios adultos, após a lesão. Manipulação genética é uma ótima ferramenta para estimular ou inibir genes específicos a fim de entender seus papéis e sua finalidade no crescimento axonal.

O uso de vetores virais tem sido muito utilizado na terapia gênica na entrega de genes para manipulação genética, alterando a função celular (RIBAS; COSTA, 2017). Nesse estudo utilizamos o cluster de miR-17~92, compreendendo os miRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92a, que antes era considerado oncogênico e posteriormente demonstrou desencadear processos fisiológicos e patológicos, inclusive no SNC (ARZHANOV; SINTAKOVA; ROMANYUK, 2022). O intuito foi analisar se a superexpressão desse miRNA influenciava o crescimento e regeneração de neuritos, através da manipulação genética de genes regulatórios da regeneração

Nos experimentos realizados, no presente projeto, com neurônios corticais *in vitro*, foi mostrado um aumento do crescimento de neuritos 35% nas culturas tratadas com o vetor viral AAV.miR-17~92 em relação ao AAV.CTRL. Foi observado um padrão semelhante ao analisar a complexidade da arborização neurítica dos neurônios cultivados. Os neurônios tratados com o vetor experimental AAV.miR-17~92 tiveram uma maior arborização de neuritos em alguns raios em relação aos neurônios tratados com o vetor controle.

A modulação na expressão de alguns alvos putativos do cluster miR-17~92 pode explicar o aumento do crescimento e arborização dos neuritos pela sua superexpressão. Esses possíveis alvos do cluster miR-17~92 poderiam ter um papel direto no crescimento de neuritos, por exemplo serem genes inibitórios do crescimento. Por outro lado, os alvos do cluster miR-17~92 poderiam ter papéis indiretos no crescimento de neuritos, através da modulação de outros genes (e.g. fatores de transcrição) ou outras vias de sinalização celular. Os alvos do cluster miR-17~92 serão discutidos mais adiante.

Portanto, pode-se afirmar que o cluster miR-17~92 teve influência significativa no crescimento e arborização de neuritos de neurônios corticais embrionários quando cultivados *in vitro*, sugerindo que ele possa modular também a capacidade regenerativa em neurônios maduros.

6.2 Regeneração e o cluster

Quando ocorre algum tipo de lesão axonal, o neurônio entra em processo de neurodegeneração onde o axônio passa por fases degenerativas aguda e crônica (ARZHANOV; SINTAKOVA; ROMANYUK, 2022). Essa degeneração axonal leva à perda da função neuronal permanentemente, pois os neurônios maduros não se regeneram devido ao microambiente não permissivo e a falta de capacidade intrínseca (VARADARAJAN *et al.*, 2022). Os eventos após lesão do SNC ainda são mal compreendidos, o que impede o desenvolvimento de tratamentos regenerativos.

Para restaurar os axônios, os miRNAs são uma ferramenta estratégica, pois são reguladores genéticos pós-transcricionais (SUN *et al.*, 2018) que atuam no silenciamento de genes/vias específicas que podem atuar na regeneração neural (EULALIO; HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2008). Os miRNAs, são RNAs não codificantes que ajustam o estado e função celular e estão sendo considerados um

importante agente na fisiopatologia de distúrbios do SNC (UYEDA e MURAMATSU, 2020).

No presente projeto investigamos se a superexpressão do cluster de miR-17~92 era favorável à regeneração de neurônios corticais em cultura primária *in vitro*, após lesão do tipo “scratch” e após a axotomia. Análises ainda preliminares mostraram um possível aumento na capacidade regenerativa após a lesão quando transduzidos com o vetor AAV.miR-17~92. Se confirmado, pode-se dizer que o cluster miR-17~92 tem um papel regenerativo *in vitro*, que pode ser traduzido para um possível efeito regenerativo em modelos *in vivo*.

6.3 Alvos do cluster miR-17~92

Segundo as análises de bioinformática, foram encontrados 251 mRNAs alvos do cluster miR-17~92. Com base nos alvos encontrados, foi feita uma análise de ontologia gênica para identificar os processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares enriquecidos dentre os genes que codificam os mRNAs alvos. Em relação aos componentes celulares, a análise mostrou que os produtos dos genes encontrados estão localizados, por exemplo, em axônios, na árvore dendrítica e nos microtúbulos. Esses resultados podem sugerir que, através da localização celular, os produtos dos genes-alvo podem estar regulando diretamente os eventos de crescimento, arborização e regeneração de neuritos (dendritos e axônios). Os processos biológicos encontrados que eram influenciados pelo cluster miR-17~92 são, por exemplo, regulação de diferenciação celular, regulação positiva do processo biossintético de macromoléculas, resposta celular ao estresse, neurogênese e resposta a fator de crescimento celular. Todos esses processos celulares mencionados poderiam estar ligados ao crescimento e regeneração axonal. Por fim, dentre as funções moleculares, ligação do correpressor de transcrição, ligação de proteína cinase e ligação de cinase, todas estão associadas ao processo de crescimento e regeneração axonal, que envolvem modulação da expressão gênica e vias de sinalização celular controladas por cinases.

A partir das análises supracitadas, foi feita uma busca manual dos genes que poderiam explicar os resultados obtidos experimentalmente. A superexpressão do cluster aumentou o crescimento e a arborização neurítica e regenerou os neurônios após a lesão e assim foram procurados genes que poderiam justificar tais fatos.

6.1.1 A via PTEN/TSC1/mTOR

As observações feitas a partir dos resultados foram que houve aumento de crescimento e da arborização dos neuritos com a superexpressão do miR-17~92. Tais aumentos poderiam ser justificados pela via PTEN/TSC1/mTOR, que é uma via capaz de controlar a regeneração neurítica (KAR *et al.*, 2021). Os efeitos observados no crescimento e regeneração de neuritos pela superexpressão do cluster miR-17~92 poderiam ser explicados por um dos alvos validados, o gene PTEN, que interessantemente não apareceu entre os alvos com os parâmetros utilizados na nossa análise de bioinformática. O gene PTEN é um supressor tumoral, regulador metabólico e sinalizador de crescimento e sobrevivência celular (CHEN, *et al.*, 2018). Segundo Kar e colaboradores, PTEN está ligado no bloqueio de crescimento axonal e na diminuição da atividade de mTOR para diminuir a tradução de mRNAs. A deleção de PTEN faz com que a mTOR regule positivamente e aumente a regeneração neuronal e a síntese de proteínas neuronais, levando ao aumento de cones de crescimento, alongamento axonal e sobrevivência celular (NING *et al.*, 2010).

Diferentes evidências apontam PTEN como um importante alvo do miR-17, um dos miRNAs que compõem o cluster miR-17~92. Já foi demonstrado que o miR-17 é capaz de se ligar a sequência 3'UTR não traduzida do mRNA de PTEN, regulando assim a sua expressão (DHAR *et al.*, 2015.; HU; LI; HE, 2017; LI; YANG, 2012). Um estudo mais direto, usando neurônios corticais primários de ratos mostrou que a superexpressão do cluster miR-17~92 aumentou substancialmente o crescimento axonal, através da regulação negativa de PTEN e aumento de mTOR fosforilada nos axônios distais (ZHANG *et al.*, 2013.). No entanto, este estudo não avaliou o efeito do cluster miR-17~92 na regeneração de neuritos ou axônios.

Outro importante componente desta via é a proteína TSC1 (Complexo de Esclerose Tuberosa 1), cujo mRNA foi identificado como alvo do miR-92 nas nossas análises de bioinformática. A proteína TSC1 é um regulador negativo de mTOR e já foi mostrado que a deleção de TSC1 promove o aumento da regeneração de axônios no nervo óptico (Park *et al.*, 2008).

Ou seja, há evidências de que os miRNAs do cluster miR-17~92 alteram a expressão de genes da via PTEN/TSC1/mTOR a favor do crescimento e regeneração neurítica através da regulação negativa de PTEN e TSC1 e a

consequente ativação de mTOR, eventos esses que poderiam explicar os efeitos da superexpressão do cluster miR-17~92 no nosso estudo.

6.1.2 Krüppel-Like Factor 13

A análise de bioinformática revelou que o mRNA codificado pelo gene KLF13 é um alvo do miR-19a, que está presente no cluster miR-17~92. Fatores semelhantes a Kruppel (KLFs) são fatores de transcrição ligados a vários processos biológicos, incluindo diferenciação de células neurais, sobrevivência neuronal e regeneração axonal (ÁVILA-MENDOZA; SUBRAMANI; DENVER, 2020). Esses fatores atuam na repressão transcricional associada a cromatina de promotores de genes-alvo (ÁVILA-MENDOZA *et al.*, 2020). Após a rede neural se formar em um organismo, os neurônios atingem sua maturidade funcional e passam a expressar novos genes. Vias de crescimento neurítico e formação de novas sinapses são desligadas para darem espaço à genes repressores de novas conexões e alongamentos. (ÁVILA-MENDOZA *et al.*, 2020). Nesta fase há uma diminuição do crescimento axonal e um aumento de repressores desse evento, como os KLFs 9 e 13. Eles podem alterar o crescimento axonal de neurônios corticais e afetar vias de sinalização como cAMP e neurotrofina inibindo o alongamento axonal (ÁVILA-MENDOZA; SUBRAMANI; DENVER, 2020). Segundo os autores Galvão *et al.* (2018), se os fatores forem inibidos ou fosforilados ou integrados com a molécula JNK3, pode promover a regeneração neural. A regulação negativa de KLF13 pelo cluster miR-17~92 também poderia explicar os efeitos de crescimento e regeneração de neuritos.

6.1.3 Rab5

Outro gene codificador de um mRNA alvo do cluster miR-17~92, mais especificamente do miR-17 e miR-20a, que também poderia estar associado aos efeitos observados é RAB5B. A proteína Rab5b pertence a uma família de GTPase com a função de regular e controlar a via endocítica e maturação de endossomos iniciais (HEO; KIM; SEOL, 2010; LIU *et al.*, 2007; NAGANO, *et al.*, 2019). Os endossomos quando positivos para Rab5 estão localizados nas vesículas pré-sinápticas e possuem um complexo chamado NGF-TrkA são chamados de endossomos sinalizadores e também afetam o volume de endocitose (HEO; KIM; SEOL, 2010; LIU *et al.*, 2007). A maturação dos endossomos é chamado conversão

de Rab, em que endossomos iniciais Rab5 convertem-se em Rab7 tardio e é mediada por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) (NAGANO, *et al.*, 2019). HEO e colaboradores (2010) mostraram que a superexpressão de uma forma constitutivamente ativa de Rab5b (Q79L) reduz o crescimento de neuritos, sugerindo que Rab5b controla negativamente o crescimento dos neuritos.

6.1.4 Smad2

Por fim, outro mRNA alvo do cluster miR-17~92 (miR-18a), que aparece nas nossas análises de bioinformática, codifica a proteína Smad2. Os Smads são um grupo de proteínas de transmissão de sinais de TGF β (ATTISANO; TUEN LEE-HOEFLICH, 2001). Estudos feitos por FRANQUINHO e colaboradores (2017), observaram que a proteína KIAA0319, uma proteína transmembranar associada à dislexia com um papel presumido na migração neuronal, reprime o crescimento axonal de neurônios hipocampais e do gânglio da raiz dorsal através da ativação de Smad2. Por outro lado, a deleção de KIAA0319 em neurônios aumenta o crescimento de neuritos *in vitro* e melhora a regeneração de axônios *in vivo*. Portanto, a regulação negativa de Smad2 também poderia explicar os efeitos observados pela superexpressão do cluster miR-17~92.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo sobre o efeito da superexpressão do cluster miR-17~92 em neurônios corticais primários mostrou que o miRNA em questão foi capaz de promover crescimento e uma maior arborização de neuritos. Dados preliminares sugerem que a regeneração de neuritos e axônios também pode estar aumentada pela superexpressão do cluster miR-17~92. Uma análise de bioinformática, identificou 251 mRNAs-alvos do miR-17~92, que estão envolvidos com processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares em parte relacionados aos processos de crescimento e regeneração de neuritos. Segundo a pesquisa de literatura, alguns genes que codificam mRNAs alvos do miR-17~92 são inibidores da regeneração axonal, portanto inibir esses genes através da expressão do cluster, seria uma interessante estratégia terapêutica para a promoção de regeneração neural. Experimentos futuros serão necessários para confirmar o efeito regenerativo do cluster miR-17~92 e identificar, em nosso modelo, quais genes estão de fato sendo regulados pelo cluster miR-17~92.

A conclusão deste trabalho irá fornecer uma melhor compreensão do efeito da superexpressão do cluster miR-17~92 na regeneração após danos no SNC. Os resultados deste trabalho podem ser importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para distúrbios neurodegenerativos baseados em terapia gênica.

REFERÊNCIAS

AHUJA, C.S. *et al.* Traumatic spinal cord injury. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017.

ARAKI, T. Mechanism of axonal degeneration: from molecular signaling to the development of therapeutic applications. **Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica**, v. 156, n. 2, p. 66-70, 2021.

ARZHANOV, I.; SINTAKOVA, K.; ROMANYUK, N. The role of miR-20 in Health and disease of the central nervous system. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1525, 2022.

ÁVILA-MENDOZA, J. *et al.* Molecular mechanisms for Krüppel-like factor 13 actions in hippocampal neurons. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 9, p. 3785-3802, 2020.

ÁVILA-MENDOZA, J.; SUBRAMANI, A.; DENVER, R.J. Krüppel-like factors 9 and 13 block axon growth by transcriptional repression of key components of the cAMP signaling pathway. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 13, p. 602638, 2020.

BLACKMORE, M.G. *et al.* Krüppel-like Factor 7 engineered for transcriptional activation promotes axon regeneration in the adult corticospinal tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 19, p. 7517-7522, 2012.

BRIAN G.B. *et al.*, **Chapter 55 - Central Nervous System**, Principles of Regenerative Medicine (Second Edition), Toronto, Academic Press, 2011.

BUCHER, K. *et al.* Immune responses to retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors—Implications for treatment success and safety. **Progress in retinal and eye research**, v. 83, p. 100915, 2021.

BULCHA, J.T. *et al.* Viral vector platforms within the gene therapy landscape. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 53, 2021.

CHEN, C.-Y. *et al.* PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 338, 2018.

CHEN, W.; HU, Y.; JU, D.. Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 8, p. 1347-1359, 2020.

CHEN, Y.H.; KEISER, M.S.; DAVIDSON, B.L. Viral vectors for gene transfer. **Current protocols in mouse biology**, v. 8, n. 4, p. e58, 2018.

CHI, H.; CHANG, H.-Y.; SANG, T.-K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3082, 2018.

COLEMAN, M. P.; HÖKE, A. Programmed axon degeneration: from mouse to mechanism to medicine. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 183-196, 2020.

DE FRERIA, C.M. *et al.* Neural stem cells: Promoting axonal regeneration and spinal cord connectivity. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3296, 2021.

DE ROOIJ, R.; KUHL, E. Physical biology of axonal damage. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 144, 2018.

DHAR, Swati *et al.* Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27214, 2015.

DONNELLY, D.J.; POPOVICH, P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Experimental neurology**, v. 209, n. 2, p. 378-388, 2008.

EGAWA, N. *et al.* Mechanisms of axonal damage and repair after central nervous system injury. **Translational stroke research**, v. 8, p. 14-21, 2017.

ELANGKOVAN, N.; DICKSON, G. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 8, n. s2, p. S303-S316, 2021.

ELI, I.; LERNER, D.P.; GHOGAWALA, Z. Acute traumatic spinal cord injury. **Neurologic Clinics**, v. 39, n. 2, p. 471-488, 2021.

EULALIO, A.; HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E.. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 9-14, 2008.

FAJARDO-SERRANO, A. *et al.* Adeno-Associated Viral Vectors as Versatile Tools for Neurological Disorders: Focus on Delivery Routes and Therapeutic Perspectives. **Biomedicines**, v. 10, n. 4, p. 746, 2022.

FANG, LL. *et al.* Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells. **International journal of molecular medicine**, v. 40, n. 6, p. 1624-1630, 2017.

FRANQUINHO, F. *et al.* The dyslexia-susceptibility protein KIAA0319 inhibits axon growth through Smad2 signaling. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 3, p. 1732-1747, 2017.

FUZIWARA, C.S.; KIMURA, E.T. Insights into regulation of the miR-17-92 cluster of miRNAs in cancer. **Frontiers in medicine**, v. 2, p. 64, 2015.

GAHLAWAT, A.W. *et al.* A novel circulating miRNA panel for non-invasive ovarian cancer diagnosis and prognosis. **British Journal of Cancer**, v. 127, n. 8, p. 1550-1556, 2022.

GALVAO, J. *et al.* The Krüppel-like factor gene target Dusp14 regulates axon growth and regeneration. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 59, n. 7, p. 2736-2747, 2018.

GOAILLARD, J.-M. *et al.* Diversity of axonal and dendritic contributions to neuronal output. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 570, 2020.

GU, H.; LIU, Z.; ZHOU, L. Roles of miR-17-92 cluster in cardiovascular development and common diseases. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

GUIDOBONI, G. *et al.* Neurodegenerative disorders of the eye and of the brain: a perspective on their fluid-dynamical connections and the potential of mechanism-driven modeling. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 566428, 2020.

HEO, H.Y.; KIM, K.-S.; SEOL, W. Coordinate regulation of neurite outgrowth by LRRK2 and its interactor, Rab5. **Experimental neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 97, 2010.

HERCULANO-HOUZEL, S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. supplement_1, p. 10661-10668, 2012.

HILL, M.; TRAN, N. miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer. *Disease models & mechanisms*, v. 14, n. 4, p. dmm047662, 2021.

HU, Haiyan; LI, Huijuan; HE, Yuanli. MicroRNA-17 downregulates expression of the PTEN gene to promote the occurrence and development of adenomyosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 4, p. 3805-3811, 2017.

ILLIS, L. S. Central nervous system regeneration does not occur. **Spinal Cord**, v. 50, n. 4, p. 259-263, 2012.

JIANG, C. *et al.* The miR-17~ 92 cluster activates mTORC1 in mantle cell lymphoma by targeting multiple regulators in the STK11/AMPK/TSC/mTOR pathway. **British journal of haematology**, v. 185, n. 3, p. 616-620, 2019.

JORGE, A.L. *et al.* MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **einstein (São Paulo)**, v. 19, 2021.

KAR, A.N. *et al.* MicroRNAs 21 and 199a-3p regulate axon growth potential through modulation of Pten and mTor mRNAs. **Eneuro**, v. 8, n. 4, 2021.

KEELER, A. M.; FLOTTE, T.R. Recombinant adeno-associated virus gene therapy in light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): where are we, and how did we get here? **Annual review of virology**, v. 6, p. 601-621, 2019

KERSCHENSTEINER, M. *et al.* In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. **Nature medicine**, v. 11, n. 5, p. 572-577, 2005.

KNÖFERLE, J. *et al.* Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 6064-6069, 2010.

KOVACS, G.G. Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. **Journal of clinical pathology**, v. 72, n. 11, p. 725-735, 2019.

KUO, G.; WU, C-Y; YANG, H-Y. MiR-17-92 cluster and immunity. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 118, n. 1, p. 2-6, 2019.

LI, F. *et al.* Glial metabolic rewiring promotes axon regeneration and functional recovery in the central nervous system. **Cell metabolism**, v. 32, n. 5, p. 767-785. e7, 2020.

LI, Haoran; YANG, Burton B. Stress response of glioblastoma cells mediated by miR-17-5p targeting PTEN and the passenger strand miR-17-3p targeting MDM2. **Oncotarget**, v. 3, n. 12, p. 1653, 2012.

LIU, J. *et al.* Nerve growth factor-mediated neurite outgrowth via regulation of Rab5. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 4, p. 1375-1384, 2007.

LIU, K. *et al.* Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 34, p. 131-152, 2011.

LIU, K. *et al.* PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 1075-1081, 2010.

LIU, S. *et al.* PTEN modulates neurites outgrowth and neuron apoptosis involving the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Molecular medicine reports**, v. 20, n. 5, p. 4059-4066, 2019.

LIU, S. *et al.* PTEN modulates neurites outgrowth and neuron apoptosis involving the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Molecular medicine reports**, v. 20, n. 5, p. 4059-4066, 2019.

LLOBET ROSELL, A.; NEUKOMM, L. J. Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease. **Open biology**, v. 9, n. 8, p. 190118, 2019.

LUDWIG, P.E.; REDDY, V.; VARACALLO, M. **Neuroanatomy, central nervous system (CNS)**. 2017.

MANDEL, R.J. *et al.* Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 3, p. 463-483, 2006.

MOGILYANSKY, E.; RIGOUTSOS, I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 12, p. 1603-1614, 2013.

MOORE, D.L. *et al.* KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability. **Science**, v. 326, n. 5950, p. 298-301, 2009.

MUDDAPU, V.R. *et al.* Neurodegenerative diseases—is metabolic deficiency the root cause? **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 213, 2020.

MURAMATSU, R.; YAMASHITA, T. Concept and molecular basis of axonal regeneration after central nervous system injury. **Neuroscience Research**, v. 78, p. 45-49, 2014.

NAGANO, M. *et al.* Rab5-mediated endosome formation is regulated at the trans-Golgi network. **Communications biology**, v. 2, n. 1, p. 419, 2019.

NASO, M.F. *et al.* Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. **BioDrugs**, v. 31, n. 4, p. 317-334, 2017.

NING, K. *et al.* PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 16, p. 3159-3168, 2010.

OGBONMIDE, T. *et al.* Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy (SMA): A Review of Current Challenges and Safety Considerations for Onasemnogene Apeparvovec (Zolgensma). **Cureus**, v. 15, n. 3, 2023.

PAN, X. *et al.* miR-17-92 cluster in osteoarthritis: Regulatory roles and clinical utility. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 2022.

PARK, K.K. *et al.* Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 963-966, 2008.

PAUNOVSKA, K.; LOUGHREY, D.; DAHLMAN, J.E. Drug delivery systems for RNA therapeutics. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 5, p. 265-280, 2022.

POMPER, N. *et al.* CNS microRNA profiles: a database for cell type enriched microRNA expression across the mouse central nervous system. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 4921, 2020.

QIAN, C.; ZHOU, F.-Q. Updates and challenges of axon regeneration in the mammalian central nervous system. **Journal of molecular cell biology**, v. 12, n. 10, p. 798-806, 2020.

RIBAS, V.T. *et al.* Attenuation of axonal degeneration by calcium channel inhibitors improves retinal ganglion cell survival and regeneration after optic nerve crush. **Molecular neurobiology**, v. 54, p. 72-86, 2017.

RIBAS, V.T.; COSTA, M.R. Gene manipulation strategies to identify molecular regulators of axon regeneration in the central nervous system. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 231, 2017

RUITENBERG, M.J. *et al.* Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system. **Methods**, v. 28, n. 2, p. 182-194, 2002.

SHEKARI, A.; FAHNESTOCK, M. Retrograde axonal transport of neurotrophins in basal forebrain cholinergic neurons. In: **Axonal Transport: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2022. p. 249-270.

SINGH, *et al.* Relationship of acute axonal damage, Wallerian degeneration, and clinical disability in multiple sclerosis. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2017.

SUN, P. *et al.* MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 38, n. 7, p. 1125-1148, 2018.

THAU, L.; REDDY, V.; SINGH, P. **Anatomy, Central Nervous System**. 2019.

UYEDA, A.; MURAMATSU, R. Molecular mechanisms of central nervous system axonal regeneration and remyelination: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8116, 2020

VARADARAJAN, S. G. *et al.* Central nervous system regeneration. **Cell**, v. 185, n. 1, p. 77-94, 2022.

WANG, J.T.; MEDRESS, Z.A.; BARRES, B.A. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 1, p. 7-18, 2012.

WANG, Z. *et al.* Overexpression of Sox11 promotes corticospinal tract regeneration after spinal injury while interfering with functional recovery. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 3139-3145, 2015.

WOLLER, S.A. *et al.* Self-delivering RNAi compounds as therapeutic agents in the central nervous system to enhance axonal regeneration after injury. **Isience**, v. 25, n. 6, p. 104379, 2022.

XIN, H. *et al.* MicroRNA-17–92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats. **Stroke**, v. 48, n. 3, p. 747-753, 2017.

YANG, P. *et al.* The role of the miR-17–92 cluster in neurogenesis and angiogenesis in the central nervous system of adults. **Journal of neuroscience research**, v. 95, n. 8, p. 1574-1581, 2017.

YIU, G.; HE, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 617-627, 2006

ZHANG, J-N; KOCH, J.C. Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration. **Neural regeneration research**, v. 12, n. 5, p. 692-695, 2017.

ZHANG, X *et al.* Biology of MiR-17-92 cluster and its progress in lung cancer. **International journal of medical Sciences**, v. 15, n. 13, p. 1443, 2018.

ZHANG, Y. *et al.* Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological intervention. **Molecular medicine reports**, v. 23, n. 6, p. 1-18, 2021.

ZHANG, Yi *et al.* The microRNA-17–92 cluster enhances axonal outgrowth in embryonic cortical neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 16, p. 6885-6894, 2013.

ZHAO, W. *et al.* The miR-17-92 Cluster: Yin and Yang in Human Cancers. **Cancer Treatment and Research Communications**, p. 100647, 2022.