

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

Raquel Alves de Almeida

**TERAPIA GÊNICA NEUROPROTETORA E REGENERATIVA PARA A
NEURODEGENERAÇÃO GLAUCOMATOSA BASEADA NA SUPEREXPRESSION
DO MIR-17**

Belo Horizonte

2020

Raquel Alves de Almeida

**TERAPIA GÊNICA NEUROPROTETORA E REGENERATIVA PARA A
NEURODEGENERAÇÃO GLAUCOMATOSA BASEADA NA SUPEREXPRESSION
DO MIR-17**

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.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Dr. Vinicius de Toledo Ribas

Belo Horizonte

2020

043

Almeida, Raquel Alves de.

Terapia gênica neuroprotetora e regenerativa para a neurodegeneração glaucomatosa baseada na superexpressão do MIR-17 [manuscrito] / Raquel Alves de Almeida. – 2020.

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

Orientador: Dr. Vinicius de Toledo Ribas.

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

1. Biologia Celular. 2. Glaucoma. 3. Terapia Genética. 4. Neuroproteção. 5. Regeneração. 6. MicroRNAs. I. Ribas, Vinicius de Toledo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
RAQUEL ALVES DE ALMEIDA COSTA

334/2020
entrada
2º/2018
2018717086

Às **quatorze horas** do dia **16 de dezembro de 2020**, 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: "**TERAPIA GÊNICA NEUROPROTETORA E REGENERATIVA PARA A NEURODEGENERAÇÃO GLAUCOMATOSA BASEADA NA SUPEREXPRESSION DO MIR-17**", 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:

Dr. Vinicius de Toledo Ribas	UFMG	APROVADA
Dra. Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG/ICB	APROVADA
Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira	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, 16 de dezembro de 2020.**

Dr. Vinicius de Toledo Ribas (Orientador) _____

Dr^a. Cristina Guatimosim Fonseca _____

Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira _____

Prof. Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida
Coordenadora do PPG em Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais

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

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiam em tudo que faço, as minhas irmãs pelo incentivo, família, amigos e a todos que participaram e contribuíram para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTO

Busco as mais adequadas palavras para expressar a minha gratidão a todos que participaram do percurso e contribuíram para a realização deste sonho. A caminhada durou além do que previa, mas tudo valeu a pena, cada lágrima, a espera, a renúncia e é claro os sorrisos e a aprendizagem. Hoje consigo olhar para trás e entender o porquê de muitas coisas. Quando tudo parecia perdido era na verdade uma nova chance. Chance de aprender um pouco mais, de ser uma pessoa melhor, consciente das minhas dificuldades, mas também consciente da minha força e determinação.

Agradeço a Deus que em sua infinita bondade, nos momentos mais difíceis não me deixou, simplesmente me pediu para ter paciência que tudo estava sobre o seu controle.

Aos meus pais Edir Alves e Geraldo Batista pelo apoio, amor incondicional, por sonharem comigo e não me deixar desistir, sem eles não teria conseguido dar mais este passo! As minhas sobrinhas Yasmim dos Reis e Alice Almeida, minhas irmãs Aline Ingrid, Denise Kelly, Dayane Cristina e seus maridos Rogério Januário e Walace Flávio pelo incentivo, apoio e carinho. A todos os meus familiares também agradeço pela ajuda financeira pessoal, pois não só de ciência vive o homem.

Ao meu orientador, Vinicius Ribas, sem ele não teria conseguido! Por toda a paciência, atenção e dedicação a este trabalho, por confiar em minha capacidade, por estender a mão e me conduzir. Em todas as etapas deste processo de aprendizagem e construção científica estive presente, compartilhando seus conhecimentos e contribuindo para a minha formação! Muito obrigada professor!

Aos amigos e colegas do laboratório, em especial aos membros da equipe Ribas Team (Paloma Farias, Carolina Gomes, Clarissa Cyrino, Victor Matos, Bárbara Gonçalves, Emily Colen, Fernanda Cambraia e Arthur Veríssimo), ao professor Victor Santos e seus alunos, muito obrigada por toda a ajuda nos experimentos e as conversas e sorrisos que deixou a caminhada mais leve e divertida. Agradeço a todos vocês, que participaram ou contribuíram de algum modo durante o percurso, tenho aprendido muito com todos, não apenas conhecimento científico, mas também aspectos relacionados à convivência em grupo.

A doutoranda do Departamento de Bioquímica e Imunologia Daniela de Laet, pela grande ajuda nos experimentos de Biologia Molecular ainda em condução e por compartilhar o seu conhecimento, bem como a sua orientadora, a professora Glória Regina, e sua coorientadora, a Pós doutoranda Daniela Ferreira.

Ao professor Uwe Michel da Universidade de Medicina de Göttingen (UMG), Alemanha, pela colaboração com os vetores virais de rAAV. Ao pós-doutorando Dr. Lucas Caldi Gomes pela contribuição nas análises de bioinformática.

Ao meu professor e orientador dos tempos da graduação, Germano Carneiro, que sempre me incentivou e acreditou em minha capacidade. Foi quem presenciou o nascer deste sonho e me fez acreditar que podia ir um pouco mais longe. Agradeço a professora de química da graduação Poliana Maia, pelas suas palavras de incentivo em momentos difíceis, o que me deu ainda mais força para prosseguir.

A professora Erika Jorge por abrir as portas da UFMG, e juntamente a professora Gerluzza Borges pela oportunidade de estagiar no laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento. Sou grata aos meninos do Labode, em especial ao Rayan Silva, Amanda Maria Sena Reis, Aline Copola, Júlia Meireles, Ricardo Nodari e Aline Costa por me receberem bem no laboratório, muito obrigada pela força, também aprendi muito com todos vocês.

Não podia deixar de agradecer aos professores e alunos da UFMG, colegas do Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado, assim como membros de outros laboratórios por comprar meus bombons durante o primeiro semestre do mestrado, foi de grande ajuda para conseguir arcar com o transporte para a UFMG e não desistir por problemas financeiros.

Finalmente, agradeço as agências de fomento, ao CNPq pela concessão da bolsa durante parte do mestrado e a International Society for Neurochemistry pela ajuda financeira para a realização deste trabalho.

RESUMO

O glaucoma, um distúrbio neurodegenerativo multifatorial, é caracterizado pela degeneração progressiva dos axônios que compõem o nervo óptico e posterior perda lenta das células ganglionares da retina (CGRs). É atualmente, a principal causa de cegueira irreversível em todo mundo, com mais de 60 milhões de pessoas afetadas. Os tratamentos atuais se concentram em diminuir a pressão intraocular. Apesar do tratamento, em um determinado grupo de pacientes, a doença continua a progredir. Diante disso, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, focadas em proteger as CGRs da morte, os seus axônios da degeneração e simultaneamente ser capaz de promover a regeneração de axônios lesados. Sendo assim, esse trabalho testou a eficácia da terapia gênica neuroprotetora e regenerativa para o glaucoma, baseada na expressão forçada do miR-17. Vetores de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) superexpressando o miR-17 (rAAV.miR-17) e expressando a proteína mCherry (rAAV.CTRL) foram utilizados para transduzir neurônios corticais *in vitro* e CGRs *in vivo* de ratos *Wistar*. O vetor de rAAV apresentou elevada eficiência de transdução em ambos os neurônios *in vitro* e *in vivo*. A cultura neuronal foi submetida à lesão do tipo “*scratch*” e feita avaliação da regeneração neurítica *in vitro*. O vetor rAAV.miR-17 foi capaz de aumentar significativamente a regeneração de neuritos nesse modelo. Nas análises *in vivo*, as CGRs foram transduzidas com os vetores virais, marcadas retrogradamente por FluoroGold e posteriormente feita a lesão do nervo óptico por esmagamento. Foi observada neuroproteção das CGRs pela superexpressão do miR-17, com um aumento significativo na sobrevivência das CGRs 28 dias após a lesão nas três regiões da retina quantificadas. Marcações contra neurofilamento H, GFAP e Iba1 foram feitas em cortes do nervo óptico. A marcação de axônios com anticorpo contra neurofilamento H e pela expressão de mCherry revelou uma maior preservação dos axônios do nervo óptico nas partes proximal e distal à lesão. Não foram observadas alterações nas marcações para astrócitos e microglia no nervo óptico pela marcação de GFAP e Iba1, respectivamente. Análises de bioinformática usando as plataformas miRWalk e miRTarBase permitiu identificar alvos preditos e validados do miR-17, respectivamente. Análises funcionais de ontologia gênica dos genes alvos preditos do miR-17 revelaram que o miR-17 possui diferentes genes alvos preditos envolvidos com processos de regeneração, degeneração e morte celular. Em conclusão, o presente estudo demonstra um efeito neuroprotetor e regenerativo da terapia gênica baseada na superexpressão do miR-17 em modelos de neurodegeneração.

Palavras-chave: neurodegeneração glaucomatosa; terapia gênica; neuroproteção; regeneração; miR-17.

ABSTRACT

Glaucoma, a multifactorial neurodegenerative disorder, is characterized by progressive degeneration of the axons that make up the optic nerve and subsequent loss of retinal ganglion cells (RGCs). It is currently the leading cause of irreversible blindness worldwide, with more than 60 million people affected. Current treatments focus on lowering intraocular pressure. Despite treatment, in a given group of patients, the disease continues to progress. Given this, it is imperative to develop new therapeutic strategies, focused on protecting the RGCs from death, their axons from degeneration and simultaneously being able to promote the regeneration of injured axons. Therefore, this work tested the effectiveness of neuroprotective and regenerative gene therapy for glaucoma, based on the forced expression of miR-17. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors overexpressing miR-17 (rAAV.miR-17) and expressing the mCherry protein (rAAV.CTRL) were used to transduce cortical neurons *in vitro* and RGCs *in vivo* of Wistar rats. The rAAV vectors showed high transduction efficiency both *in vitro* and *in vivo*. The culture was subjected to a scratch lesion and evaluation of neuritic regeneration was performed. The rAAV.miR-17 was able to significantly increase neurite regeneration *in vitro*. For the *in vivo* analysis, RGCs were transduced with rAAV vectors, retrogradely traced by FluoroGold and subsequently an optic nerve crush was performed. Neuroprotection of RGCs was observed by overexpression of miR-17, with a significant increase in RGCs survival 28 days after the lesion in the three regions of the retina quantified. Immunostaining for neurofilament, GFAP and Iba1 was performed in optic nerve cryosections. Axonal staining by antibody against neurofilament and by the expression of mCherry revealed axonal protection in the optic nerve in the proximal and distal regions to the lesion. There was no change in astrocytes and microglia in the optic nerve by GFAP and Iba1 staining, respectively. Bioinformatics analysis using the miRWalk and miRTarBase platforms allowed the identification of predicted and validated miR-17 targets, respectively. Functional analysis of gene ontology of the predicted target genes of miR-17 showed that miR-17 has several predicted target genes involved with regeneration, degeneration and cell death. In conclusion, the present study demonstrated the neuroprotective and regenerative effect of the gene therapy based in the overexpression of miR-17 in models of neurodegeneration.

Keywords: glaucomatous neurodegeneration, gene therapy, neuroprotection, regeneration, miR-17.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representando os tipos de degeneração axonal.....	20
Figura 2 - Mecanismos extrínsecos de inibição do crescimento axonal no SNC adulto.....	24
Figura 3 - Organização esquemática da retina de mamíferos.....	29
Figura 4 - Desenho esquemático da cabeça do nervo óptico em um olho saudável e no glaucoma.....	32
Figura 5 - Biogênese de microRNA.....	38
Figura 6 - Mapas dos vetores de rAAV.....	45
Figura 7 - Produção de vetores de rAAV.....	46
Figura 8 - Teste de transdução do vetor rAAV.miR-17 em cultura primária de neurônios corticais.....	52
Figura 9 - Regeneração de neuritos <i>in vitro</i> após transdução com os vetores rAAV.mCherry e rAAV.miR-17.....	53
Figura 10 - Teste de transdução do vetor rAAV.miR-17 na retina <i>in vivo</i>	54
Figura 11 - Fotomicrografias por microscopia de fluorescência da montagem plana da retina após transdução com o vetor rAAV.miR-17.....	55
Figura 12 - Análise da sobrevivência das CGRs.....	57
Figura 13 - Análise da região proximal do nervo óptico.....	59
Figura 14 - Análise da região distal do nervo óptico.....	60
Figura 15 - Análise dos astrócitos na região distal do nervo óptico.....	61
Figura 16 - Análise das micróglia na região distal do nervo óptico.....	62
Figura 17 - Análise dos genes alvos preditos do miR-17.....	64
Figura 18 - Análises funcionais dos genes alvos preditos do miR-17.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes alvos preditos do miR-17 selecionados com papéis em morte celular, degeneração e regeneração axonal.....	65
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4E-BP1 - Proteína-1 de Ligação ao Fator de Iniciação Eucariótica 4E (do inglês *Eukaryotic Initiation Factor 4E-binding Protein-1*)
- 3'UTR - Região 3' Não Traduzida (do inglês *3' Untranslated Region*)
- Ago - Argonauta
- Akt - Homólogo de oncogene viral de timoma murino V-akt 1
- Arg1 - Arginase tipo 1
- ATF3 - Fator de Transcrição Ativador 3 (do inglês *Activating Transcription Factor 3*)
- Atg - Proteína relacionada a autofagia
- Bax - Proteína 2 do linfoma de células B associada ao X
- Bcl-2 - Proteína 2 do linfoma de células B
- BSA - Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- CAP'5 - sinal CAP na extremidade 5'
- Cap23 - Proteína cortical do citoesqueleto 23
- CAP1 - Centro de Aquisição e Processamento de Imagem
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFNR - Camada de Fibras Nervosas da Retina
- CGRs - Células Ganglionares da Retina
- CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar (do inglês *Ciliary Neurotrophic Factor*)
- DAA - Degeneração Axonal Aguda
- DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindol
- DGCR8 - Gene 8 da Região Crítica da Síndrome de DiGeorge (do inglês *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*)
- DIV - Dia *in vitro*
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- DUSP14 - Fosfatase-14 de Especificidade Dupla (do inglês *Dual Specificity Phosphatase-14*)
- E18 - Dia embrionário 18
- EFNA5 - Efrina 5
- EGFR-PTK - Proteína Tirosina Cinase do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor Protein Tyrosine Kinase*)
- EphA5 - Receptor de Efrina 5
- ERK - Cinase regulada por Sinal Extracelular (do inglês *Kinase Regulated by Extracellular Signal*)

Exp-5 - Exportina 5

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)

FGF7 - Fator de Crescimento Fibroblástico 7 (do inglês *Fibroblastic Growth Factor 7*)

GAP43 - Proteína Associada ao Crescimento 43 (do inglês *Growth-associated Protein 43*)

RAGs - Genes Associados à Regeneração (do inglês *Genes Associated with Regeneration*)

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial (do inglês *Glial Fibrillary Acid Protein*)

gp130 - Receptor de transdução de sinal glicoproteína 130

GSK-3 β - Glicogênio Sintase Cinase-3 β

HEPES - Ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico

hSyn - Sinapsina humana

Iba1- Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1

IL-6 - Interleucina 6

ITR - Sequências Terminais Repetidas Invertidas (do inglês *Repeated Inverted Terminal Strings*)

JAK - Janus Cinase

KEGG - Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto

KLF - Fator de Transcrição do tipo Krüppel (do inglês *Krüppel-type Transcription Factor*)

LCA2 - Amaurose Congenita de Leber Humana tipo 2 (do inglês *Human Leber Congenital Amaurosis type 2*)

LC3 - Proteína associada a microtúbulos 1A / 1B-cadeia leve 3

LES - Lesão do tipo “*scratch*”

LIF - Fator Inibidor de Leucemia (do inglês *Leukemia Inhibitory Factor*)

lincRNAs - Grandes RNAs não-codificantes intergênicos

lncRNAs - RNAs não codificadores longos

LNO - Lesão do Nervo Óptico

MAG - Glicoproteína Associada a Mielina (do inglês *Myelin-associated Glycoprotein*)

MAP-2 - Proteína Associada a Microtúbulo (do inglês *Protein Associated with Microtubule 2*)

MAPK - Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (do inglês *Mitogen-activated Protein Kinase*)

MEK - Proteína Cinase Cinase Ativada por Mitógeno (do inglês *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*)

miRNAs - micro-RNAs

mRNA - RNA mensageiro

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

mTOR - Alvo de rapamicina em mamíferos

ncRNAs - RNAs não codificadores

NF-200 - Neurofilamento 200

NGS - Soro de Cabra Normal (do inglês *Normal Goat Serum*)

Nmnat1 - Enzima biossintética da nicotinamida adenina dinucleotídeo nuclear

NO - Nervo Óptico

Nogo ou Rtn4 - Reticulona-4

OCT - Tomografia de Coerência Óptica

OMgp - Glicoproteína de Mielina Oligodendrócita (do inglês *Oligodendrocyte Myelin glycoprotein*)

PBS - Salina Tamponada com Fosfato (do inglês *Phosphate-buffered Saline*)

PKC α - Cinase Dependente de Fosfatidilinositol 1/2 (do inglês *1/2 Phosphatidylinositol Dependent Kinase*)

PFA - Paraformaldeído

PI3K - fosfatidilinositol-3 cinase

PIO - Pressão intraocular

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5 - bifosfato

PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5 - trifosfato

piRNAs - RNAs interagindo com PIWI

PPD - p-Fenilenodiamina

PQ - Dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio

pré-miRNA - Molécula precursora de miRNA maduro

pri-miRNA - Transcrito primário de miRNA

PTEN - Fosfatase e Homólogo de Tensina (do inglês *Phosphatase and Tensin Homolog*)

rAAV - Vetor de Vírus Adenoassociado recombinante

RAF - Fibrossarcoma Rapidamente Acelerado (do inglês *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

RAS - Sarcoma de Rato (do inglês *Rat Sarcoma*)

RGMa - Molécula de Orientação Repulsiva a (do inglês *Repulsive Orientation Molecule a*)

RISC - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (do inglês *RNA-induced Silencing Complex*)

RNase III - endoribonuclease III

ROCK - Proteína Cinase Associada a Rho (do inglês *Effector Rho-associated Protein Kinase*)

RPE65 - Proteína 65 Específica do Epitélio Pigmentar da Retina (do inglês *Retinal Pigment Epithelium Specific Protein 65*)

rRNA - RNA ribossômico

siRNA - RNAs de interferência

S6K - p70 ribossomal S6 cinase

SMI32 - *Sternberg Monoclonals Incorporated product no.32*

SNC - Sistema Nervoso Central

snoRNAs - RNAs nucleolares pequenos

SNP - Sistema Nervoso Periférico

snRNAs - RNAs nucleares pequenos

SOCS - Supressor da Sinalização de Citocinas (do inglês *Suppressor of Cytokine Signaling*)

SOX11 - Caixa SRY contendo o gene 11

Sprr1a - Pequena proteína rica em prolina 1a

STATs - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (do inglês *Signal Transducer and Transcription Activator*)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês *Tumor Necrosis Factor- α*)

TNFR1 - Receptor do Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor 1 Receptor*)

Trks - Receptor Tirosina cinase transmembrana de passagem única

tRNAs - RNAs de transferência

TSC1 - Complexo de Esclerose Tuberosa 1 (do inglês *Tuberous Sclerosis Complex 1*)

TSC2 - Complexo de Esclerose Tuberosa 2 (do inglês *Tuberous Sclerosis Complex 2*)

Ube4b - Fator de ubiquitina E4B

ULK1 - Cinase 1 de ativação de autofagia semelhante a unc-51

Wlds - Degeneração Walleriana Lenta (do inglês *slow Wallerian degeneration*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Neurodegeneração no sistema nervoso central	18
1.2 Mecanismos de regeneração de axônios no sistema nervoso central	22
1.3 Mecanismos intrínsecos envolvidos com a regeneração axonal no SNC	24
1.4 Retina e nervo óptico	27
1.5 Glaucoma	30
1.5.1 Neurodegeneração glaucomatosa	32
1.5.2 Estratégias neuroprotetoras e regenerativas no Glaucoma	32
1.6 RNAs não codificadores	33
1.6.1 MiRNAs: estrutura, função e biogênese	34
1.6.2 Papel de miRNAs no sistema nervoso central	37
1.6.3 MiRNA-17: funções no sistema nervoso	37
1.7 Terapia gênica ocular e vetores de rAAV	39
2. OBJETIVOS	41
2.1 Geral	41
2.2 Específicos	42
3. METODOLOGIA	42
3.1 Clonagem e produção dos vetores de vírus adeno-associado recombinante (rAAV)	42
3.2 Modelo in vitro de cultura primária de neurônios corticais	44
3.3 Teste da eficiência de transdução dos vetores virais in vitro	44
3.4 Regeneração de neuritos in vitro	44
3.5 Injeções intravítrea de rAAV	45
3.6 Injeções estereotáxicas	45
3.7 Esmagamento do nervo óptico	46
3.8 Análise da sobrevivência das células ganglionares da retina	46
3.9 Análise do nervo óptico	46
3.10 Imunohistoquímica	47
3.11 Análise de bioinformática dos alvos do miR-17	47
3.12 Análise estatística	48
4. RESULTADOS	48
4.1 Eficiência da transdução em cultura de neurônios corticais	48
4.2 rAAV.miR-17 aumenta a regeneração de neuritos in vitro	49

4.3 Eficiência da transdução in vivo	50
4.4 Análise de sobrevivência das células ganglionares da retina.....	53
4.5 Análise do nervo óptico	55
4.6 Análise de bioinformática dos alvos do miR-17	60
5. DISCUSSÃO	62
5.1 Transferência gênica mediada por vetores de rAAV in vitro e in vivo	62
5.2 miR-17 e regeneração no SNC.....	64
5.3 Efeito neuroprotetor do miR-17 nas CGR in vivo	64
5.4 Análise do nervo óptico	67
5.5 Mecanismos envolvidos com os efeitos neuroprotetor e regenerativo do miR-17	67
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neurodegeneração no sistema nervoso central

A neurodegeneração no sistema nervoso central (SNC) é um processo fisiopatológico caracterizado pela degeneração axonal e morte dos corpos celulares de neurônios. Admite-se que ambos, degeneração axonal e morte celular, possam ser iniciados por uma ampla gama de processos moleculares, ainda não elucidados completamente, e que apresentam relevante papel em contextos patológicos, como nas lesões traumáticas, acidente vascular encefálico e nas doenças neurodegenerativas crônicas (Wang Yu *et al.*, 2018). Em diversos distúrbios neurodegenerativos como na doença de Parkinson, glaucoma e também em lesões traumáticas a degeneração axonal é um evento precoce e ocorre antes da morte neuronal (Lingor *et al.*, 2012; Maddineni *et al.*, 2020).

Em lesões traumáticas agudas em axônios no SNC, como a que ocorre na lesão medular e do nervo óptico (NO), um programa de autodestruição axonal é ativado rapidamente culminando em alterações moleculares e morfológicas. Inicialmente ocorre o processo de degeneração axonal aguda (DAA) de curta distância (Figura 1), que se estende por cerca de 300-500 μm em ambos os lados da lesão, proximal e distal (Kerschensteiner *et al.*, 2005; Knöferle *et al.*, 2010). A DAA é caracterizada pelo súbito aumento dos níveis intracelulares de íons cálcio e ativação de proteases da família das calpaínas que atuam clivando o citoesqueleto, resultando em uma rápida fragmentação axonal local em questão de poucas horas (Kerschensteiner *et al.*, 2005; Knöferle *et al.*, 2010). Após 24 a 72 horas da lesão, a degeneração axonal ocorre de maneira distinta comparando os segmentos axonais proximal e distal (Wang *et al.*, 2012). A porção axonal distal da lesão sofre uma fragmentação chamada degeneração Walleriana, que se estende por toda porção distal do axônio, resultando em total desintegração dessa porção do axônio (Confort *et al.*, 2014). Na porção proximal dos axônios lesados, ocorre a formação de uma estrutura na ponta do axônio chamada bulbo de retração (Figura 1) (Hill, 2017). Essa porção degenera progressivamente em direção ao corpo celular em um processo lento chamado de degeneração axonal retrógrada (“*slow dieback*”) (Hill, 2017). Esse tipo de degeneração retrógrada lenta também foi descrita como estando envolvida em diferentes doenças neurodegenerativas crônicas (Yaron & Schuldiner 2016).

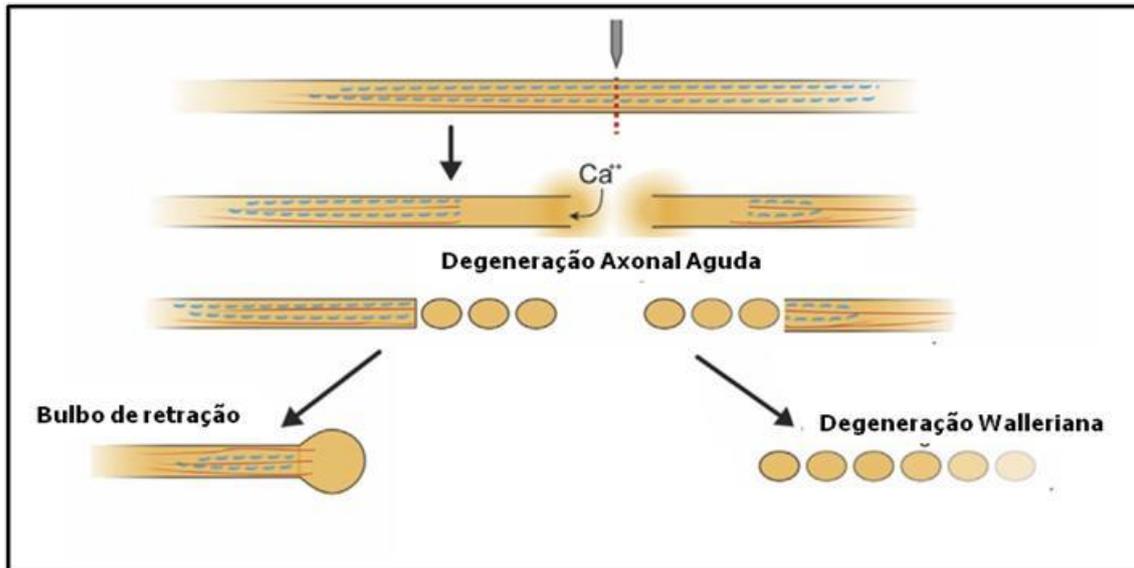


Figura 1 – Esquema representando os tipos de degeneração axonal. Após lesão traumática em axônios ocorre a entrada de íons cálcio. O primeiro tipo de degeneração é chamado de degeneração axonal aguda, que acomete ambos os lados. Após esse processo degenerativo inicial a porção distal (direita) sofre um processo chamado de degeneração Walleriana. Já a porção proximal sofre a degeneração retrógrada com formação do bulbo de retração. Adaptado de Hill *et al.*, 2017.

Estes diferentes tipos de degeneração axonal compartilham mecanismos moleculares, pelo menos em parte. De fato, Raff *et al.* (2002) já especularam que a degeneração Walleriana compartilha semelhanças moleculares com a degeneração retrógrada (Raff *et al.*, 2002). No entanto, até agora, essa especulação foi testada principalmente no modelo de expressão de uma proteína de fusão entre o fator de ubiquitina E4B (Ube4b) e a enzima Nmnat1 chamada degeneração Walleriana lenta (Wlds), que demonstrou retardar a degeneração Walleriana em diferentes modelos (Yaron & Schuldiner, 2016). Os resultados obtidos com essa proteína mutante são mistos, onde em alguns modelos a Wlds de fato retarda a degeneração retrógrada, mas não em todos (Yaron & Schuldiner, 2016). Além da degeneração retrógrada, a DAA também pode ser afetada pela Wlds (Kerschensteiner *et al.*, 2005), sugerindo a existência de mecanismos comuns entre os processos de degeneração axonal.

Os mecanismos moleculares envolvidos na DAA foram avaliados em diferentes estudos utilizando o NO e medula espinhal como modelos. Trabalhos do nosso grupo e de outros demonstraram anteriormente que a inibição de canais de cálcio pelo tratamento combinado de três inibidores (amlodipina, NBQX e amilorida) bloqueou quase que completamente a degeneração axonal aguda causada pelo esmagamento do NO ao inibir o influxo de íons cálcio, além de promover aumento da sobrevivência das células ganglionares da retina (CGRs) e aumento da regeneração axonal (Knöferle *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2017).

Em modelos de esmagamento do NO Zhang *et al.*, (2016) demonstraram que a calpaína é ativada precocemente durante a DAA no NO e que sua inibição bloqueia quase que completamente a fragmentação axonal no lado proximal à lesão e atenua a DAA no lado distal ao esmagamento. Identificaram ainda a proteína mediadora da resposta da colapsina 2 (CRMP2), como sendo o principal alvo a jusante da calpaína e sua superexpressão em experimentos *in vitro* em neurônios corticais axotomizados promoveu um atraso na formação dos bulbos axonais e resgatou o transporte mitocondrial. Em conjunto, estes experimentos demonstraram que tanto a inibição da calpaína quanto a superexpressão de um de seus alvos promoveu uma atenuação significativa da DAA no lado proximal à lesão (Zhang *et al.*, 2016).

Além da ativação das calpaínas, o influxo de íons cálcio também promove a aumento da ativação da via autofágica, importante mecanismo catabólico aumentado na degeneração axonal (Knöferle *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013; Ribas *et al.*, 2015). Em diversos trabalhos anteriores nosso grupo e outros têm concentrado em investigar a extensão e o papel da autofagia no curso da degeneração axonal (Knöferle *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2015; Ribas & Lingor 2015; Balke *et al.*, 2020; Vahsen *et al.*, 2020). Knoferle *et al.* (2010) buscaram caracterizar eventos precoces da degeneração axonal após esmagamento do NO. Constataram que a inibição da autofagia pela aplicação local de 3-metiladenina no NO atenuou a degeneração axonal e estabilizou os axônios em degeneração, sugerindo um efeito prejudicial da autofagia na DAA (Knoferle *et al.*, 2010). Em um estudo envolvendo modelo de lesão medular nosso grupo analisou a regulação das proteínas autofágicas ULK1, Atg7, Atg5 e LC3 durante eventos iniciais de degeneração axonal (Ribas & Lingor, 2015). Foi identificada ativação precoce e sustentada da autofagia, onde as proteínas avaliadas foram rapidamente aumentadas após a lesão medular juntamente com um número aumentado de autofagossomos positivos para LC3, uma proteína marcadora de autofagossomos, inferindo assim que a autofagia parece ser uma importante etapa inicial na degeneração axonal após lesão traumática (Ribas & Lingor, 2015).

Em um modelo da doença de Parkinson, induzida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), nosso grupo analisou o efeito neuroprotetor da inibição da autofagia pela superexpressão do dominante negativo de ULK1 (ULK1.DN), uma proteína que ativa a autofagia. A superexpressão do ULK1.DN mediada por vetores de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) promoveu potencial efeito neuroprotetor no modelo analisado, com diminuição da degeneração nos axônios nigroestriatais causada por MPTP (Balke *et al.*, 2020). Recentemente, nosso grupo investigou ainda o papel de ULK1, usando a mesma estratégia anterior, na degeneração axonal em diferentes modelos de lesão axonal

traumática *in vitro* e *in vivo* (Vahsen *et al.*, 2020). O tratamento *in vitro* com o vetor rAAV.ULK1.DN em neurônios corticais primários promoveu uma diminuição na expressão de proteínas autofágicas ULK1 e LC3-II, uma diminuição da degeneração axonal após a axotomia *in vitro* e uma atenuação da DAA após esmagamento do NO *in vivo*. Da mesma forma o tratamento com o inibidor farmacológico de ULK1 (SBI-0206965) *in vitro* e *in vivo* atenuou a resposta autofágica em ambos os modelos analisados protegendo contra a degeneração axonal (Vahsen *et al.*, 2020). Tomados em conjunto, estes trabalhos corroboram para o efeito benéfico da inibição da autofagia na atenuação da degeneração axonal, indicando que a manipulação desta via faz-se uma importante estratégia terapêutica para promover a proteção de axônios.

Além da degeneração dos axônios, a morte celular neuronal desempenha papel crítico não apenas no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares, mas também na patogênese de diversos distúrbios neurodegenerativos. Uma variedade de mecanismos de morte celular neuronal pode ser ativada em diferentes contextos, incluindo: apoptose, necroptose, morte celular autofágica, dentre outros programas recentemente identificados (Fricker *et al.*, 2018).

A apoptose, um tipo de morte celular programada, acontece pela ativação de duas vias de sinalização principais, a via extrínseca e a via intrínseca, extensivamente caracterizadas (Hengartner, 2000, apud Derakhshan *et al.*, 2017). Na via extrínseca um receptor de morte na superfície da célula, como TNFR1 é ativado após ligação ao seu respectivo ligante, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Flusberg e Sorger, 2015). A porção citoplasmática do receptor recruta proteínas adaptadoras, formando o complexo de sinalização indutor de morte, que desencadeia a ativação da caspase-8, iniciadora da apoptose (Derakhshan *et al.*, 2017). Na via intrínseca apoptótica fatores intracelulares, como danos ao DNA ou a retirada de fatores de crescimento promovem uma permeabilização da membrana mitocondrial externa que resulta na liberação de fatores pró-apoptóticos para o citosol, (Schleich & Lavrik, 2013), desencadeando a apoptose pela ativação de caspases (Derakhshan *et al.*, 2017). Outros dois importantes mecanismos de morte neuronal são a necroptose, uma forma geneticamente programada e regulada de necrose, recentemente identificada (Huang *et al.*, 2018; Fricker *et al.*, 2018) e a morte celular autofágica, uma via catabólica que medeia a homeostase celular (Hirt *et al.*, 2018; Fricker *et al.*, 2018), mas em um modo disfuncional pode causar a degeneração axonal (Vahsen *et al.*, 2020) e morte neuronal (Ribas *et al.*, dados não publicados; Wang Yu *et al.*, 2018).

Os diferentes mecanismos de morte celular neuronal, bem como a degeneração axonal que podem ocorrer nas lesões traumáticas e distúrbios degenerativos do SNC promovem a perda de populações de neurônios resultando em déficits permanentes de suas funções. Ainda que tais neurônios sobrevivam às injúrias degenerativas faz-se necessária a identificação e manipulação dos mecanismos necessários à regeneração axonal, podendo assim recuperar a função perdida.

1.2 Mecanismos de regeneração de axônios no sistema nervoso central

No SNC de mamíferos adultos, os neurônios lesionados não são capazes de regenerar seus axônios, assim, danos causados ao SNC podem resultar em déficits funcionais permanentes (Giger *et al.*, 2010; Hilton & Bradke, 2017; Ribas & Costa, 2017). Entretanto, durante o desenvolvimento, os neurônios estendem eficientemente os seus axônios em direção as células alvo para o estabelecimento de circuitos neuronais. Da mesma forma, os neurônios do sistema nervoso periférico (SNP) após sofrerem uma lesão, frequentemente regeneram seus axônios a longas distâncias podendo alcançar recuperação funcional (Giger *et al.*, 2010).

Assim, diversos estudos nas últimas décadas têm buscado caracterizar os mecanismos moleculares que restringem a regeneração do SNC adulto, o que é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para promoção da recuperação funcional neste sistema (Huebner & Strittmatter, 2009; Sun & He, 2010; Mahar & Cavalli, 2018).

A falha regenerativa apresentada pelo SNC adulto tem sido atribuída à perda da capacidade intrínseca de crescimento axonal ao longo do desenvolvimento e ao ambiente extracelular inibitório. O SNC adulto apresenta um meio não permissivo ao crescimento axonal, que decorre da presença de moléculas inibitórias na matriz extracelular, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs), glicoproteínas que compõem a mielina e moléculas de orientação repulsivas de axônios (netrina, efrina e semaforinas) (Figura 2A) (Giger *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2018). As moléculas repulsivas e os proteoglicanos são liberados por células que constituem a cicatriz glial reativa formada ao redor da lesão, composta por astrócitos reativos, microglias e fibroblastos meníngeos que migram para o local da lesão e constituem uma barreira física ao crescimento axonal (Figura 2B) (Giger *et al.*, 2010).

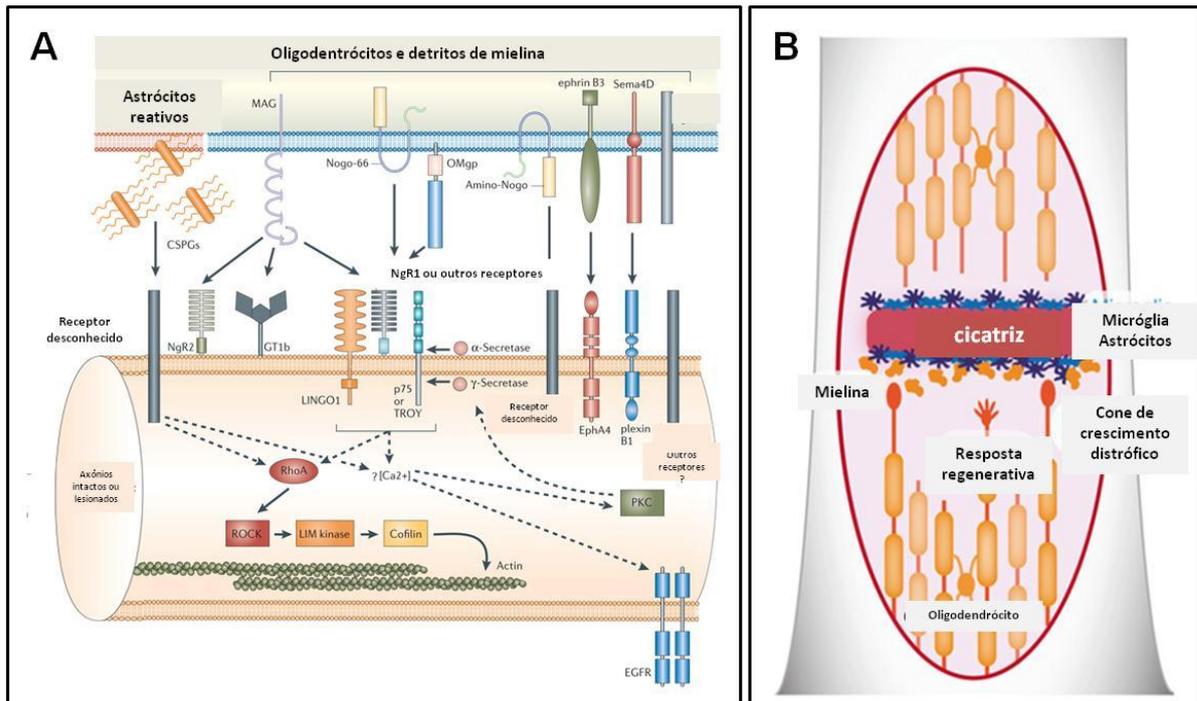


Figura 2 – Mecanismos extrínsecos de inibição do crescimento axonal no SNC adulto. (A) Estão representadas as moléculas de proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs) liberadas por astrócitos reativos da cicatriz glial; moléculas de orientação repulsiva de axônios (efrina e semaforinas) e as moléculas inibitórias associadas à mielina de oligodentrócitos: glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína de mielina oligodendrócita (OMgp) e reticulona 4 (Rtn4 ou Nogo). Além disso, também são mostrados os receptores neuronais e as vias de sinalização intracelular ativadas pelos sinais inibitórios da glia. Adaptado de Yiu & He., 2006. (B) Ao redor da lesão é formada uma cicatriz glial reativa, composta por astrócitos reativos e micróglia, constituindo barreira física ao crescimento axonal. Também constitui impedimento à tentativa de regeneração as moléculas inibidoras associadas à mielina que promovem colapso do cone de crescimento. Adaptado de Murray, 2014.

Entretanto, a principal causa para a limitada capacidade regenerativa do SNC adulto de mamíferos é a perda da capacidade intrínseca de crescimento axonal dos neurônios ao longo do desenvolvimento (He & Jin, 2016; Mahar & Cavalli, 2018) devido a expressão de genes que restringem a regeneração e a inibição de genes que ativam a regeneração. Acredita-se que a expressão destes genes seja um mecanismo evolutivamente conservado para evitar o crescimento axonal ectópico e a formação de sinapses aberrantes (Hilton & Bradke, 2017).

Diante disso, tem sido foco de numerosas pesquisas a compreensão de genes-chave que controlam a capacidade regenerativa intrínseca dos neurônios do SNC adulto (Ribas & Costa, 2017; Mahar & Cavalli, 2018), onde vias de sinalização e programas transcricionais que corroboram para o crescimento celular durante o desenvolvimento devem ser identificadas e

reativadas (Belin *et al.*, 2015; Hilton & Bradke, 2017), além da manipulação do ambiente extracelular para permitir o alongamento axonal e o reestabelecimento de circuitos funcionais (Hilton & Bradke, 2017).

1.3 Mecanismos intrínsecos envolvidos com a regeneração axonal no SNC

A ocorrência de um processo regenerativo axonal bem sucedido depende da competência intrínseca do neurônio em ativar um programa de crescimento, com a ativação de vias de sinalização pró-regenerativas e a expressão de genes associados à regeneração (RAGs), como GAP43, Cap23, Arg1 e Sprr1a (Sun & He, 2010). Três importantes vias de sinalização têm sido identificadas como vias chave no processo regenerativo axonal: a via PI3K/Akt/mTOR; a via JAK/STAT3/SOCS3 e a via RAF/MEK/ERK (Park *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011).

Evidências mostram que a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é uma importante via para a sobrevivência, proliferação, migração e síntese de proteínas nas células (Cantley & Neel, 1999), sendo uma via crucial nos processos de crescimento e proliferação de células-tronco neurais adultas (Peltier *et al.*, 2007). Em neurônios, a molécula alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) atua como uma molécula-chave de uma via bem estabelecida no processo de regeneração axonal (Ribas & Costa, 2017; Mahar & Cavalli, 2018). Diversos estudos têm demonstrado que a manipulação da via PI3K/Akt/mTOR através da deleção de seus reguladores negativos PTEN, TSC1 e TSC2 promove o aumento robusto da regeneração de axônios no SNP (Chen *et al.*, 2018) e SNC (Park *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). Contudo, os mecanismos a montante e a jusante que promovem a ativação de mTOR ainda não são completamente compreendidos (Mahar & Cavalli, 2018).

Sabe-se que em resposta a ativação do receptor tirosina cinase (Trk), a enzima PI3K é recrutada e associa-se ao domínio citoplasmático do receptor. PI3K promove a conversão de fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5 – trifosfato (PIP3). PIP3 por sua vez recruta e ativa a cinase PDK1/2, que fosforila e ativa a cinase Akt (Sun & He 2010). Uma série de reguladores negativos de mTOR são inibidos por Akt, resultando na ativação de mTOR. mTOR está envolvida com a ocorrência de diversos processos celulares que corroboram para o crescimento celular, sendo a síntese proteica o processo crítico para a ocorrência da regeneração axonal (Mahar & Cavalli, 2018). A proteína cinase S6K e o regulador de tradução 4E-BP1 são algumas das moléculas efetoras de mTOR, sendo que a tradução proteica ocorre principalmente pela fosforilação de tais moléculas (Mendoza *et al.*, 2011). PTEN é o principal regulador negativo da via mTOR. Trata-se de uma enzima que converte PIP3 em PIP2, desse modo inibindo a atividade de Akt mais a jusante na via. Logo, a

deleção de PTEN resulta na ativação de mTOR (Mahar & Cavalli, 2018) e produz um dos efeitos mais robustos na regeneração axonal (Park *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011). A administração de rapamicina, um inibidor de mTOR, abole o efeito causado pela deleção de PTEN, demonstrando que a regeneração axonal é dependente desta via de sinalização (Sun & He, 2010).

Outra via de sinalização com importante papel modulador na regeneração axonal é a cascata JAK/STAT3/SOCS3 (Liu *et al.*, 2015). Diversos estudos têm demonstrado que a manipulação genética desta via pode resultar em promoção da sobrevivência celular e regeneração axonal (Miao *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009; Pernet *et al.*, 2013; Elsaedi *et al.*, 2014). Citocinas e fatores de crescimento, incluindo IL-6, CNTF e LIF atuam em complexos receptores dependentes do receptor gp130, desencadeando a ativação da cascata JAK/STAT3/SOCS3 (Kisseleva *et al.*, 2002; Heinrich *et al.*, 2003; Rawlings *et al.*, 2004). A transdução de sinais inicia-se com a cinase JAK que fosforila STATs, incluindo STAT3, induzindo a sua dimerização e translocação para o núcleo, onde irá regular a expressão de genes alvos para a regeneração do axônio (Sun & He, 2010; Qin *et al.*, 2013). Estudos têm mostrado que STAT3 quando fosforilado é translocado para o núcleo onde ativa a expressão de GAP-43 promovendo a extensão de neuritos (Wu & Bradshaw, 1996; Leibinger *et al.*, 2013). No entanto, no SNC adulto a ativação desta via promove a regulação positiva de um inibidor de STAT, conhecido como SOCS, incluindo SOCS3, limitando assim, a regeneração axonal resultante da sinalização de citocinas e fatores de crescimento (Sun & He, 2010; Ribas & Costa, 2017).

A via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) RAF/MEK/ERK também constitui importante via no processo regenerativo axonal. Compreende uma cascata de fosforilação desencadeada por sinais extracelulares iniciados na membrana plasmática e que são transmitidos para o núcleo (Guo *et al.*, 2018). Neurotrofinas se ligam e ativam receptores Trks. A jusante dos receptores Trks a sinalização continua via cinase RAS, que uma vez ativada recruta a cinase RAF dimerizada para a membrana plasmática, onde é ativada por outras cinases ou mesmo por autofosforilação. RAF por sua vez, fosforila e ativa as proteínas cinases MEK que subsequentemente fosforilam as cinases ERK a jusante na via formando um complexo de sinalização MEK/ERK. As proteínas ERK ativadas se dissociam do complexo MEK/ERK e podem atuar fosforilando outras cinases, proteínas citoplasmáticas e fatores de transcrição nuclear que levam à expressão de proteínas que desempenham papéis importantes no crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Madhunapantula & Robertson, 2008). Em células neuronais a ativação desta via pode desencadear os processos de regeneração

axonal e crescimento neurítico (Li Wei-Peng *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2015). No entanto, a inibição da via MEK/ERK em CGRs após lesão do nervo óptico (LNO) promoveu aumento da sobrevivência celular (Luo *et al.*, 2007) contrapondo, deste modo, o efeito pró-sobrevivência normalmente resultante da ativação desta via.

As vias de sinalização envolvidas com o crescimento e a regeneração axonal, muitas das vezes, regulam ou são reguladas por fatores de transcrição (Ribas & Costa, 2017; Venkatesha & Blackmorea, 2017), moléculas ativadoras ou repressoras da transcrição. O controle transcricional tem sido identificado como um importante processo regulador da capacidade intrínseca de crescimento dos axônios através do controle da expressão de RAGs. Diversos fatores de transcrição vem sendo implicados na regulação de genes-alvos envolvidos com o crescimento e regeneração axonal, tais como: KLF; SOX11; c-Jun e ATF3, dentre outros (Seijffers *et al.*, 2007; Venkatesha & Blackmorea, 2017). Alguns destes fatores de transcrição foram identificados como sendo críticos para o crescimento do axônio durante o desenvolvimento e a manipulação dos mesmos pode representar importante estratégia para promover a regeneração de axônios adultos (Caiazzo *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Norsworthy *et al.*, 2017). Estudos têm relatado uma modulação na expressão e atividade de fatores de transcrição como c-Jun, ATF3, SOX11 e KLFs após lesão axonal em neurônios centrais ou periféricos, onde desempenham importantes papéis no programa de regeneração axonal, contribuindo assim, para o crescimento neurítico e até mesmo para o reparo neuronal de funções perdidas (Jankowski *et al.*, 2006; Seijffers *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011; Fagoe *et al.*, 2015; Galvao *et al.*, 2018; Wang Zimei *et al.*, 2018).

Raivich *et al.* (2004) investigaram o papel de c-Jun no desenvolvimento e na regeneração axonal em um modelo de transecção do nervo facial em camundongos transgênicos nulos para c-Jun. A inativação de c-Jun específica para o SNP não teve efeito relevante para o desenvolvimento, onde o único fenótipo identificado foi um aumento no número de motoneurônios faciais. No entanto, a ausência de c-Jun promoveu maiores impactos na regeneração axonal, com a expressão prejudicada de moléculas associadas a regeneração (CD44, galanina e integrina $\alpha 7\beta 1$) e reinervação do alvo prejudicada, sugerindo, deste modo, um mecanismo para o crescimento axonal mediado por c-Jun. Outro estudo, identificou ainda que a ativação da via JNK1/c-Jun, após acidente vascular cerebral, pode promover regeneração axonal através da regulação positiva dos níveis de expressão de moléculas envolvidas com o crescimento e regeneração axonal, tais como GAP-43, NF-200 e MAP-2 (Zheng *et al.*, 2018).

Análises de perfil genético permitiram identificar SOX11 como um relevante fator de transcrição para o programa de crescimento do axônio em CGRs. No entanto, a promoção da regeneração por SOX11 é célula-específica, onde a superexpressão deste fator de transcrição promoveu regeneração axonal substancial em algumas CGRs após esmagamento do NO, ao passo que levou a morte das CGRs do tipo α (α -RGCs) (Norsworthy *et al.*, 2017). SOX11 também foi implicado na regeneração em axônios corticospinais (Wang *et al.*, 2015), bem como na promoção da regeneração do SNP (Chandran *et al.*, 2016).

Uma importante família de fatores de transcrição com papel na regeneração axonal é a família dos fatores KLF. A análise da expressão gênica em CGRs de peixe-zebra, após LNO, revelou os fatores KLF6a e KLF7a como essenciais para o crescimento axonal robusto, implicando-os como importantes mediadores da regeneração axonal (Veldman *et al.*, 2007). Em contraste, membros desta família podem atuar suprimindo a capacidade intrínseca de crescimento axonal. Por exemplo, a depleção dos fatores KLF4 ou KLF9 em CGRs promove regeneração axonal de longa distância após LNO (Moore *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2013; Apara *et al.*, 2017).

Identificar as vias de sinalização, os genes associados à regeneração, assim como os fatores de transcrição que controlam a expressão de tais genes pode representar importante estratégia para a compreensão dos mecanismos envolvidos no controle da degeneração e regeneração no SNC. Neste contexto, a retina e o NO têm sido usados como importantes modelos de estudo de mecanismos envolvidos com neuroproteção e regeneração.

1.4 Retina e nervo óptico

A retina é uma fina camada de tecido neuronal sensorial que reveste internamente a cavidade posterior do globo ocular (Lent, 2010; Machado & Haertel, 2014). A retina pertence ao SNC, sendo considerada uma extensão do encéfalo (Rashid *et al.*, 2019). Apresenta uma estrutura laminar altamente complexa organizada em camadas sinápticas e nucleares (Figura 3) (Kandel *et al.*, 2014; Grossniklaus *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2015).

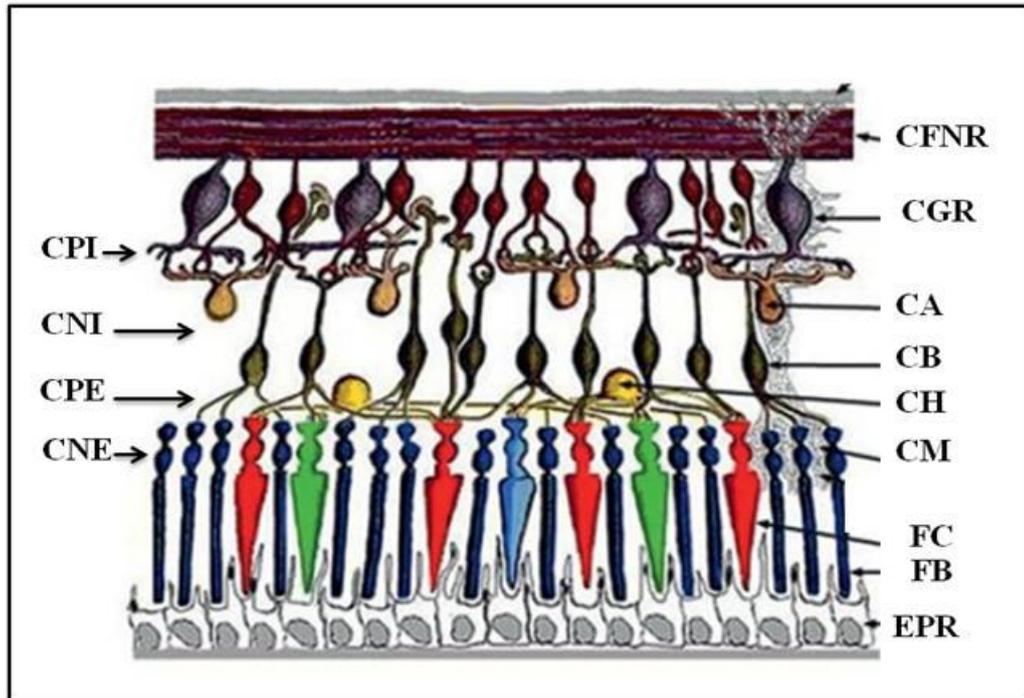


Figura 3 – Organização esquemática da retina de mamíferos. CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CPE: camada plexiforme externa; CNE: camada nuclear externa; CFNR: camada de fibras nervosas da retina; CGR: célula ganglionar da retina; CA: célula amácrina; CB: célula bipolar; CH: célula horizontal; CM: célula de Muller; FC: fotorreceptor do tipo cone; FB: fotorreceptor do tipo bastonete; EPR: epitélio pigmentar da retina. Adaptado de Prasad & Galetta, 2011.

A partir do epitélio pigmentar em direção ao centro do globo ocular tem-se a camada mais externa, constituída pelos segmentos externos dos fotorreceptores, os neurônios da retina sensíveis à luz. Em seguida tem-se a camada nuclear externa, composta pelos corpos celulares destas células. A camada seguinte é a camada nuclear interna, esta abriga os corpos celulares das células bipolares, células horizontais e amácrinas. E a camada mais interna da retina é constituída pelos corpos celulares das CGRs, os neurônios de saída da retina. Entre as camadas nucleares estão dispostas as camadas plexiformes externa e interna, constituídas pelos prolongamentos celulares dos neurônios (axônios e dendritos) (Bear *et al.*, 2015; Grossniklaus *et al.*, 2015).

Posterior à camada de CGRs tem-se a camada de fibras nervosas da retina (CFNR), constituída pelos axônios das CGRs. Os axônios das CGRs convergem em uma região chamada disco ou papila óptica por onde deixa o globo ocular formando o NO, segundo par de nervos cranianos, que são responsáveis pela transmissão da informação visual processada na retina para os centros visuais no encéfalo (Lent, 2010; Bear *et al.*, 2015). Os dois nervos

ópticos se encontram para formar o quiasma óptico e deste partem os dois tratos ópticos em direção aos respectivos corpos geniculados laterais (Machado & Haertel, 2014).

A retina é responsável pelo processamento visual de nível inferior, estágio inicial de análise de imagens visuais (Kandel *et al.*, 2014). A luz incidida sobre a retina atravessa todas as camadas nucleares da retina até alcançar os fotorreceptores, onde é convertida em sinal neuronal, processo chamado fototransdução (Molday & Moritz, 2015). A informação visual gerada pelos fotorreceptores é transmitida para as células bipolares, com modulação pelas células horizontais e amácrinas, alcançando as CGRs, onde a informação é processada e transformada em potencial de ação, transmitido via NO para os centros visuais superiores no encéfalo (Prasad & Galetta, 2011).

Além das células neuronais descritas anteriormente, a retina de mamíferos possui ainda três tipos distintos de células gliais: células de Muller, astrócitos e microglia (Rashid *et al.*, 2019). Os neurônios da retina e as células gliais estabelecem interações importantes para a manutenção da homeostase, barreira hemato-retiniana, suporte estrutural e metabólico (Vecino *et al.*, 2016). As células de Muller constituem o elemento glial predominante, atravessa toda a extensão da retina e são as principais células responsáveis pela manutenção da homeostase da retina (Fernández-Sánchez *et al.*, 2015; Vecino *et al.*, 2016). Os astrócitos estão quase que exclusivamente restritos às camadas retinianas mais internas, entre a CFNR e compõem a barreira hemato-retiniana (Vecino *et al.*, 2016). E o terceiro tipo glial encontrado na retina é a microglia, célula fagocítica também responsável pela homeostase da retina (Rashid *et al.*, 2019).

Devido a sua simplicidade estrutural, acessibilidade e possibilidade de manipulação o NO constitui modelo amplamente utilizado para o estudo de degeneração e regeneração axonal no SNC (Knöferle *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2017; Ribas & Costa, 2017). O NO, bem como demais estruturas pertencentes ao SNC apresenta limitada capacidade regenerativa, como resultado de influências ambientais e da perda da capacidade intrínseca regenerativa ao longo do desenvolvimento (Laha *et al.*, 2017). Como consequência, após lesões traumáticas ou condições neurodegenerativas, como o glaucoma ou demais neuropatias ópticas, os axônios das CGRs degeneram precocemente e posteriormente ocorre a morte destas células (Maddineni *et al.*, 2020). Além disso, a falta de resposta regenerativa destas células leva a perda irreversível e permanente da função visual (Luo *et al.*, 2013; Crair *et al.*, 2016). Assim, diversos estudos têm buscado reduzir os sinais inibitórios extracelulares e principalmente identificar estratégias para estimular a capacidade regenerativa intrínseca, como por exemplo,

a manipulação de programas moleculares (Park *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2013).

O conhecimento da estrutura e função da retina e NO torna-se essencial para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que podem acometer tais estruturas nas neuropatias ópticas, sobretudo na neurodegeneração glaucomatosa, marcada pela degeneração dos axônios do NO e morte das CGRs.

1.5 Glaucoma

O glaucoma é um grupo heterogêneo de condições caracterizado pela degeneração progressiva dos axônios que compõem o NO, com posterior perda gradual de CGRs (Munemasa & Kitaoka, 2013; Kimura *et al.*, 2017). Nesta condição ocorre um afinamento da CFNR, deformação da lâmina cribrosa (estrutura colagenosa que sustenta a cabeça do NO) e uma escavação da cabeça do NO (Figura 4) (Weinreb *et al.*, 2016). Tais modificações na estrutura da retina e NO resultam em um comprometimento do transporte da informação visual do olho para o encéfalo, reduzindo assim a acuidade visual (Gauthier & Liu, 2016; Lawlor *et al.*, 2017).

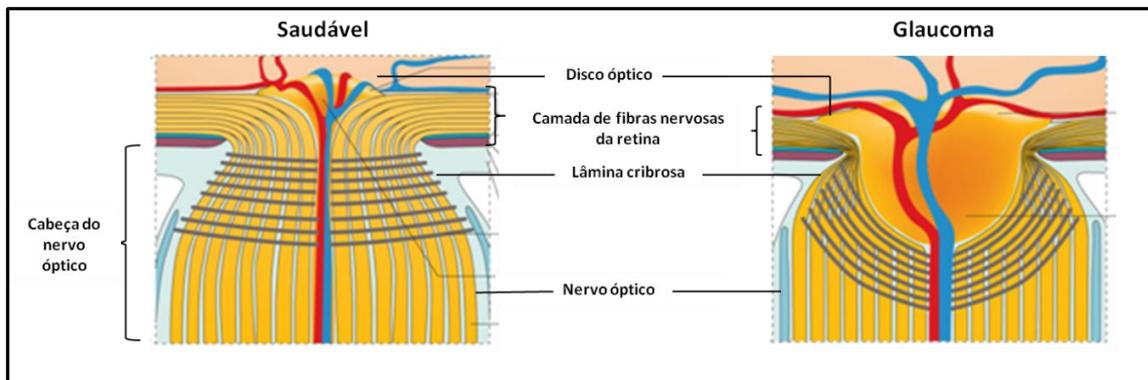


Figura 4 – Desenho esquemático da cabeça do nervo óptico em um olho saudável e no glaucoma.

À esquerda é mostrada uma situação de um olho saudável. A camada de fibras nervosas da retina é formada pelos axônios das CGRs estes convergem na região chamada disco óptico iniciando a cabeça do NO. Imediatamente tem-se uma região composta por fibras colagenosas, a lâmina cribrosa que envolve os axônios ainda não mielinizados do NO. À direita são mostradas as modificações sofridas pelas estruturas da retina e NO mediante neurodegeneração glaucomatosa, onde ocorre uma escavação da cabeça do NO com conseqüente aumento do disco óptico, diminuição da espessura da CFNR e alterações na estrutura da lâmina cribrosa. Adaptado de Weinreb *et al.*, 2016.

Atualmente, o glaucoma é considerado a principal causa de cegueira irreversível em todo o mundo, com mais de 60 milhões de pessoas afetadas (Jutley *et al.*, 2017). Estima-se que 3,5% da população mundial com mais de 40 anos tenha glaucoma e que até 2040 a doença poderá afetar um total de 112 milhões de pessoas (Gauthier & Liu, 2016; Yap *et al.*,

2018). Estudos epidemiológicos globais sugerem que no Brasil, cerca de 2 milhões de pessoas sejam portadores do glaucoma (Ministério da Saúde, 2014).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento e progressão da doença são: idade avançada, pressão intraocular (PIO) elevada, etnia, história familiar positiva para o glaucoma e miopia (Jonas *et al.*, 2017). Destes, a elevação da PIO é o único fator de risco modificável (Crish & Calkins, 2011; Gauthier & Liu, 2016; Jutley *et al.*, 2017). A cabeça do NO é o principal local de lesão no glaucoma e a PIO desempenha papel fundamental na fisiopatologia da doença (Evangelho *et al.*, 2019). A PIO é determinada por um equilíbrio entre a produção de humor aquoso pelo corpo ciliar e a drenagem deste fluido através da malha trabecular ou via uveoscleral. Quando a produção do humor aquoso supera a capacidade de drenagem ocorre um aumento da PIO (Weinreb *et al.*, 2016).

A aplicação tópica de medicamentos constitui tratamento de primeira linha para o glaucoma. Tal abordagem farmacológica se concentra em reduzir a PIO através do aumento da absorção do humor aquoso ou diminuição da sua produção (Weinreb *et al.*, 2016). Os análogos de prostaglandinas são os medicamentos tópicos geralmente mais empregados para a redução da PIO, devido apresentar efeitos adversos sistêmicos mínimos e aplicação uma única vez ao dia. Medicamentos que reduzem a PIO através da diminuição da secreção aquosa incluem, por exemplo, agonistas α -adrenérgicos, β -bloqueadores tópicos e os inibidores da anidrase carbônica (Wójcik-Gryciuk *et al.*, 2016). Os principais problemas do uso tópico destes medicamentos é o uso incorreto dos mesmos pelos pacientes e a necessidade de aplicações diárias podendo resultar em baixa adesão ao tratamento. Outras abordagens terapêuticas para o glaucoma incluem a realização de cirurgia e terapia à laser (Cohen & Pasquale 2014). Ambas as modalidades de tratamento resultam em uma maior vazão do humor aquoso, reduzindo deste modo a PIO (Wójcik-Gryciuk *et al.*, 2016). Apesar dos esforços em reduzir a PIO a doença pode ocorrer em todos os níveis de PIO e alguns indivíduos podem apresentar um aumento da PIO sem danos no NO (Weinreb *et al.*, 2016).

Existem diferentes tipos de glaucoma, podendo ser classificado em primário, secundário, glaucoma com fechamento angular e com ângulo aberto (Evangelho *et al.*, 2019). A classificação em primário ou secundário refere-se à determinação da causa, sendo que no glaucoma primário a causa é desconhecida (Weinreb *et al.*, 2016). Os dois principais tipos são o glaucoma de ângulo aberto e o glaucoma de ângulo fechado, diferenciados segundo a configuração anatômica do fluxo de saída do humor aquoso (Gupta & Chen, 2016). No glaucoma de ângulo aberto, o subtipo mais comum, a via de drenagem através da malha trabecular é acessível ao humor aquoso, porém ocorre uma resistência interna a este fluxo; ao

passo que, no glaucoma de ângulo fechado a íris faz um ângulo fechado com o canal de Schlemm, bloqueando a saída do humor aquoso através da malha trabecular (Dietze *et al.*, 2020). Há ainda o glaucoma de pressão normal, onde a PIO não é alterada, mas mesmo assim ocorre a perda de CGR (Esporcatte & Tavares, 2016). Independente do tipo de glaucoma, um processo neurodegenerativo é desencadeado levando a perda visual (Weinreb *et al.*, 2016).

1.5.1 Neurodegeneração glaucomatosa

A perda da visão no glaucoma é atribuída à degeneração dos axônios e morte das CGRs (Jutley *et al.*, 2017), sendo a apoptose o principal mecanismo de morte destas células na doença (Weinreb *et al.*, 2016). Duas vias apoptóticas podem ser ativadas na neurodegeneração glaucomatosa. Na via extrínseca, TNF- α ou outro ligante membro desta família se liga ao seu respectivo receptor de morte e desencadeia a ativação de uma cascata de caspases (Thomas *et al.*, 2017). Na via intrínseca, um dos mecanismos envolvidos é o influxo aumentado de íons cálcio, que promove a ativação da calpaína, resultando mais a jusante na via, na liberação do citocromo c de mitocôndrias, iniciando assim a apoptose (Evangelho *et al.*, 2019). Outros mecanismos de morte neuronal têm sido relatados na neurodegeneração glaucomatosa, incluindo a morte celular autofágica, com evidências crescentes de seu envolvimento na perda de CGRs após elevação da PIO (Park *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013).

Múltiplos fatores têm sido implicados na degeneração axonal glaucomatosa, embora grande parte destes permaneça elusiva (Munemasa & Kitaoka, 2013). Um aumento da PIO pode resultar em danos na cabeça do NO, com interrupção do transporte axonal; além da ativação de vários mecanismos intrínsecos degenerativos (Koch & Lingor, 2016). Os eventos fisiopatológicos gerados na cabeça do NO parecem induzir uma cascata de eventos degenerativos ao longo de toda a projeção óptica (Calkins *et al.*, 2012).

Estudar mecanismos de degeneração glaucomatosa é importante uma vez que o conhecimento de tais mecanismos pode levar ao desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras. Além disso, a proteção das CGRs é uma pré-condição para a promoção da regeneração dos axônios do NO no glaucoma.

1.5.2 Estratégias neuroprotetoras e regenerativas no Glaucoma

O glaucoma tem se tornado cada vez mais prevalente com o crescimento da população envelhecida, sendo que a diminuição da PIO é o único fator modificável (Feiner & Piltz-Seymour, 2003; Hyman *et al.*, 2005). No entanto, estima-se que em torno de metade dos pacientes que conseguem reduzir adequadamente a PIO a morte progressiva das CGRs continue a evoluir (Leske *et al.*, 2003; Hyman *et al.*, 2005). Ademais, existe ainda a problemática da adesão do paciente a tais tratamentos. Essas evidências destacam a

importância de estratégias terapêuticas capazes de interromper a progressão da neurodegeneração glaucomatosa, baseadas na neuroproteção das CGRs e independentes da PIO, assim como estratégias que promovam a regeneração destas células. Assim sendo, torna-se atraente o emprego de uma terapia que forneça resultados benéficos duradouros ou permanentes, com efeitos colaterais sistêmicos mínimos, sendo a terapia gênica uma promissora abordagem terapêutica para a neurodegeneração glaucomatosa (Liu Xuyang *et al.*, 2009; Ratican *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a fisiopatologia molecular da neurodegeneração glaucomatosa tem sido progressivamente delineada, oferecendo caminhos para o desenvolvimento de diferentes técnicas terapêuticas (Liu Xuyang *et al.*, 2009). Para o glaucoma, uma doença multifatorial crônica não monogênica, as estratégias terapêuticas têm se concentrado principalmente em retardar ou prevenir a degeneração axonal e a morte neuronal das CGRs por meio de agentes neuroprotetores e que simultaneamente promovam a regeneração dos axônios que compõem o NO (Ratican *et al.*, 2018). Terapias atuais neuroprotetoras para o glaucoma incluem neuroproteção farmacológica, tratamento com células-tronco mesenquimais e terapia gênica (Khatib *et al.*, 2017; Almasieh & Levin, 2017; Osborne *et al.*, 2018).

As novas terapias devem ainda estimular a regeneração de axônios lesados (Chang & Goldberg, 2012), uma vez que a retina e o NO são componentes do SNC, e apresentam, portanto, limitada capacidade regenerativa (Velde *et al.*, 2015; Calkins *et al.*, 2017). Vias pró-regenerativas precisam ser identificadas e reativadas através da expressão aumentada de genes promotores do crescimento celular, bem como o bloqueio de vias inibidoras do processo regenerativo. Portanto, é provável que um tratamento eficaz para distúrbios neurodegenerativos, como o glaucoma, baseado em terapia gênica deva ser capaz de modular a expressão de diferentes genes simultaneamente. Neste contexto, a modulação de moléculas que regulam a expressão gênica parece constituir uma promissora estratégia para o reparo do SNC, tendo em vista o emprego de RNAs não codificadores (ncRNAs), particularmente os micro-RNAs (miRNAs).

1.6 RNAs não codificadores

Os ncRNAs são uma classe de moléculas cuja mensagem não é traduzida em proteína, mas que desempenham papéis cruciais em numerosos processos celulares, atuando como reguladores-chave na expressão de genes de múltiplas vias, enquanto outros apresentam importantes funções estruturais para a célula (Hombach & Kretz, 2016; Li *et al.*, 2016).

Projetos de sequenciamento de genes revelaram que menos de 2% da sequência genômica total transcrita é traduzida em proteína (Wilusz *et al.*, 2009). As demais moléculas

de RNAs transcritas (cerca de 98% restante) não traduzidas em proteínas são conhecidas como ncRNAs (Laurent & Wahlestedt, 2007). Tais moléculas foram, por muito tempo, consideradas como artefato experimental ou “lixo”. No entanto, evidências crescentes têm demonstrado que tais moléculas de ncRNAs podem, de fato, apresentar funcionalidade (Salta *et al.*, 2012; Peschansky & Wahlestedt, 2014).

Os ncRNAs podem ser agrupados em duas classes principais em função do tamanho que apresentam: ncRNAs curtos, com menos de 200 nucleotídeos de comprimento e ncRNAs longos (lncRNAs), com um comprimento acima de 200 nucleotídeos (Peschansky & Wahlestedt, 2014). Os ncRNAs podem ser categorizados ainda em muitos tipos diferentes, como os RNAs nucleares pequenos (snRNAs), RNAs nucleolares pequenos (snoRNAs), RNAs de transferência (tRNAs), RNAs ribossômicos (rRNAs), RNAs interagindo com PIWI (piRNAs), grandes RNAs não-codificantes intergênicos (lincRNAs) e os miRNAs. Os miRNAs têm sido mostrados como sendo particularmente importantes para o ajuste fino das redes neuronais, emergindo como moduladores-chave de diversas condições fisiológicas e patológicas, incluindo as doenças neurodegenerativas (Salta *et al.*, 2012; Hirose *et al.*, 2014; Basak *et al.*, 2016).

1.6.1 MiRNAs: estrutura, função e biogênese

Os miRNAs desempenham papéis cruciais em numerosos processos celulares (Li *et al.*, 2016). Possuem fita simples, um comprimento entre 19 a 25 nucleotídeos, e atuam como moduladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (Filho *et al.*, 2006; Basak *et al.*, 2016). Foram identificados pela primeira vez em 1993, a partir de estudos sobre o desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). Na época, Victor Ambros e sua equipe identificaram uma molécula de 22 nucleotídeos codificado pelo gene *lin 7* capaz de se ligar à sequência não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro do gene *lin 14* de *C. elegans* e assim bloquear a sua tradução em uma proteína funcional (Lee *et al.*, 1993). Apesar da identificação dos miRNAs em 1993, foi somente no início dos anos 2000 que foram de fato caracterizados e descritos como parte de uma grande família de moléculas regulatórias presentes em vários organismos e envolvidos em diversos processos biológicos (Lee & Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2005).

Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ao se ligar através de sua sequência de sementes (6-7 nucleotídeos de comprimento na extremidade 5' do miRNA) (Hirose *et al.*, 2014) à sequência 3'UTR de mRNAs-alvo ou ainda em regiões codificadoras de proteínas, reduzindo assim, os níveis proteicos dos seus genes-alvo (Filho *et al.*, 2006). Cada miRNA tem a capacidade de regular centenas de transcritos de mRNAs (Hutchison *et al.*, 2009), com

o silenciamento gênico pós-transcricional podendo ocorrer através de dois mecanismos principais: (i) degradação de mRNA-alvo e (ii) repressão traducional (Basak *et al.*, 2016). Quando o miRNA se liga de modo perfeito ao seu mRNA-alvo em regiões codificadoras de proteínas ocorre a degradação do mRNA; e o pareamento imperfeito entre as bases nitrogenadas na região 3'UTR do mRNA resulta em inibição da tradução, sem que ocorra clivagem do mRNA-alvo, sendo este o principal mecanismo de atuação dos miRNAs em mamíferos (Filho *et al.*, 2006; Basak *et al.*, 2016).

A correspondência incompleta entre o miRNAs e o mRNAs em animais, fornece a possibilidade de cada miRNA possuir inúmeros genes-alvo, onde cada miRNA pode se ligar em média a 200 mRNAs diferentes, e deste modo pode atuar regulando múltiplas vias de sinalização e diferentes processos biológicos simultaneamente (Gaudet *et al.*, 2018). Análises de bioinformática preveem que cerca de 30-60% dos genes de mamíferos podem ser regulados pelos miRNAs (Gaudet *et al.*, 2018). Apesar dos miRNAs apresentarem funções ainda não totalmente compreendidas, tais moléculas chamam a atenção da comunidade científica pelas evidências sugestivas de seu envolvimento em diversos processos biológicos, ao regular processos como a apoptose, proliferação, diferenciação, hematopoese, sobrevivência, regeneração neuronal, dentre outros (Filho *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2017).

A biogênese de miRNAs ocorre em várias etapas, onde cada uma conta com a participação de enzimas específicas, nucleares e citosólicas, que realizam a transcrição, o processamento inicial da molécula, o transporte do miRNA para o citoplasma e o processamento e estabilidade final da molécula (Filho *et al.*, 2006; Basak *et al.*, 2016). Os miRNAs são transcritos a partir de regiões intragênicas ou intergênicas pela RNA polimerase II ou RNA polimerase III no núcleo da célula (Su *et al.*, 2016). É gerado um longo transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) contendo um sinal CAP'5 na extremidade 5' e uma calda poli-A na extremidade 3'. O transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) formado apresenta uma estrutura em *hairpin*, semelhante a um grampo de cabelo, então a enzima RNase III, DROSHA e seu cofator DGCR8, realizam o primeiro processamento do pri-miRNA clivando parte desta estrutura e gerando uma molécula precursora de miRNA maduro (pré-miRNA), com cerca de 70 nucleotídeos (Figura 5) (Basak *et al.*, 2016). O pré-miRNA é reconhecido pela exportina 5 (Exp-5) um fator de exportação nuclear que usa a molécula de Ran-GTP como cofator. Através de complexos de poros nucleares o pré-miRNA ligado a Exp-5 é ativamente translocado para o citoplasma, onde GTP é hidrolisado a GDP e a Exp-5 libera o pré-miRNA (Figura 5) (Su *et al.*, 2016).

No citoplasma a RNase III, Dicer, realiza o processamento final da molécula de miRNA formando um duplex de aproximadamente 22 nucleotídeos. O duplex é incorporado ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC), constituído, entre outras, pelas proteínas argonautas, cuja principal função é fornecer estabilidade a uma das fitas no miRNA, enquanto a outra fita do duplex é liberada. A molécula de miRNA assim formada, conjugada ao complexo efetor RISC, apresenta, portanto, a sua funcionalidade em regular a expressão de genes ao se ligar ao seu mRNA-alvo e reprimir sua expressão através do bloqueio da tradução ou direcionamento do seu mRNA alvo para degradação via proteossoma (Figura 5) (Su *et al.*, 2016; O'Brien *et al.*, 2018).

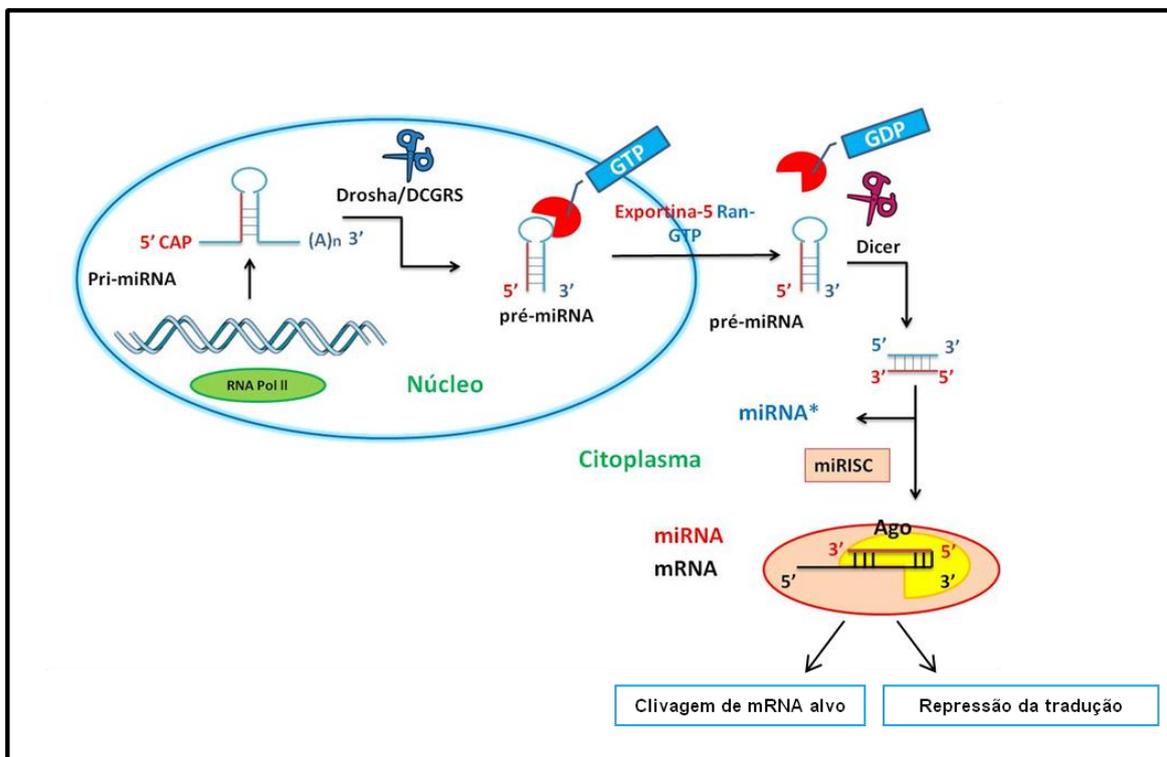


Figura 5 - Biogênese de microRNA. A síntese de microRNA inicia-se no núcleo da célula, onde a enzima RNA polimerase II (RNA Pol II) realiza a transcrição da fita de DNA gerando um transcrito primário de microRNA (Pri-miRNA). Posteriormente a enzima RNase III, DROSHA e seu cofator DGCR8 realizam o processamento inicial da molécula produzindo o pré-miRNA. O pré-miRNA é então reconhecido pelo fator de exportação nuclear Exportina-5 Ran-GTP que transloca a molécula através do complexo de poros nucleares para o citoplasma da célula. O pré-miRNA sofre um segundo processamento pela RNAase Dicer produzindo, assim, a molécula de miRNA final que permanece associada ao complexo miRISC, para realizar então realizar a interferência no processo de tradução proteica. Adaptado de Saba *et al.*, 2014.

1.6.2 Papel de miRNAs no sistema nervoso central

O cérebro, em comparação com outros órgãos, apresenta elevada expressão de miRNAs específicos (Su *et al.*, 2016). Os miRNAs desempenham papéis cruciais no controle da função neuronal, despontando como reguladores-chave na diferenciação de células-tronco neuronais, neurogênese, crescimento neurítico, sobrevivência neuronal, sinapatogênese, plasticidade sináptica (Basak *et al.*, 2016), além de participarem da ativação e resolução da resposta inflamatória (Baltimore *et al.*, 2008). O envolvimento dos miRNAs na regulação da expressão de genes associados à neurodegeneração tem sido mostrado recentemente (Salta *et al.*, 2012; Basak *et al.*, 2016). Além disso, um grande número de estudos tem demonstrado um nível alterado na expressão de miRNAs em vários distúrbios neurodegenerativos (Drewry *et al.*, 2018; Masoud *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Martinez & Peplow, 2020), sugerindo que essas moléculas possam ter funções importantes em processos neurodegenerativos.

Além do envolvimento dos miRNAs em distúrbios neurodegenerativos, na última década um número crescente de trabalhos demonstrou que essas moléculas também são capazes de controlar processos regenerativos. Por exemplo, estudos têm mostrado o papel de muitos miRNAs no processo de regeneração nervosa periférica, incluindo orientação axonal (Iyer *et al.*, 2014), modulação fenotípica de células de Schwann (Li *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2018) e remielinização (Wang *et al.*, 2017). A compreensão do papel de miRNAs na fisiologia normal e na doença (Hutchison *et al.*, 2009), e nos mecanismos regulatórios associados à regeneração do SNP é importante uma vez que este conhecimento poderá ser empregado em abordagens para a reativação de programas transcricionais de regeneração similares no SNC.

Dentre os diversos microRNAs recentemente identificados com papéis no SNC e SNP está o miR-17, despontando como um importante regulador de diversos processos biológicos e vias de sinalização regenerativas.

1.6.3 MiRNA-17: funções no sistema nervoso

O miR-17 pertence ao cluster miR-17-92, que compreende outros cinco microRNAs maduros (miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a e miR-92a) (Zhou *et al.*, 2013). Foi identificado que o miR-17 é fortemente expresso em células-tronco embrionárias e desempenha papéis essenciais em diversos processos celulares fundamentais, como regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação celular, apoptose e autofagia, de uma maneira dependente do tecido (Dellago *et al.*, 2016; An *et al.*, 2016).

Estudos identificaram que o miR-17-5p parece atuar no controle da proliferação de vários tipos celulares, uma vez que possui como alvos diversas proteínas envolvidas no

controle da progressão do ciclo celular, sobretudo na transição entre as fases G1 e S, podendo atuar como um supressor de tumor ou oncogene dependendo do contexto celular (Cloonan *et al.*, 2008). No tecido nervoso, Sun *et al.* (2020) mostraram que o miR-17 atua inibindo a proliferação e induzindo a diferenciação de células progenitoras da retina. Esse achado foi importante uma vez que se cogita o emprego das células progenitoras da retina para tratamento de distúrbios neurodegenerativos da retina. No córtex cerebral, o miR-17 é altamente expresso durante os estágios iniciais de desenvolvimento e seus níveis de expressão diminuem gradualmente à medida que o córtex se desenvolve (Mao *et al.*, 2014). Esses achados sugerem que o miR-17 possui importantes papéis no desenvolvimento do sistema nervoso.

Diversos estudos têm mostrado níveis desregulados do miR-17, dentre outros miRNAs, em diferentes processos fisiopatológicos em vários distúrbios neurodegenerativos (Kusuda *et al.*, 2011, Liu & Xu, 2011, Yan *et al.*, 2012). Na lesão medular, foi mostrado que ocorre uma alteração nos níveis de expressão de diversos miRNAs após lesão (Hong *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016), incluindo o miR-17 (Liu Nai-Kui *et al.*, 2009), o que sugere o uso do miR-17 como um biomarcador nos processos neurodegenerativos.

Usando um modelo de lesão medular em camundongos, Hong *et al.* (2014) investigaram o papel funcional do miR-17-5p na astrogliose reativa, um dos processos que ocorre durante lesões no SNC e que inibe a regeneração axonal. Identificaram que após a lesão medular ocorre uma regulação positiva do miR-17-5p. Além disso, demonstraram que o miR-17-5p é um importante regulador da proliferação de astrócitos reativos, uma vez que a deleção de *Dicer1* promoveu uma regulação negativa do miR-17-5p e induziu um fenótipo imaturo dos astrócitos (Hong *et al.*, 2014). No entanto, ainda não se sabe exatamente se esse fenótipo produzido pela deleção da *Dicer1* é via regulação negativa específica do miR-17-5p ou de algum outro miRNA.

Ainda em modelos de lesão medular em camundongos Luan *et al.* (2016) investigaram a relação entre o miR-17 e a via PI3K/Akt/mTOR. Verificaram que a superexpressão de miR-17 inibe a expressão de PTEN em astrócitos, um inibidor da via mTOR. Demonstraram assim, que a regulação negativa de PTEN direcionada pela superexpressão de miR-17 promoveu ativação da via mTOR resultando em formação de cicatriz glial reativa, uma barreira física e bioquímica à regeneração axonal (Luan *et al.*, 2016). Apesar destes estudos que mostraram importantes papéis do miR-17 em células gliais, pouco se sabe sobre o seu papel especificamente em neurônios.

Neste contexto, estudo de ganho e perda de função mostram que o miR-17 é capaz de regular eventos neurodegenerativos. Dentre estes estudos foi identificado um possível papel neuroprotetor do miR-17-5p, onde sua superexpressão promoveu atenuação da apoptose, estimulada por ionóforo de cálcio, em cultura celular de motoneurônios da medula espinhal (Chakrabarti *et al.*, 2014). Em um modelo de neurodegeneração dopaminérgica induzido por dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (PQ) foi verificada uma alteração no perfil de expressão de vários miRNAs, dentre estes identificaram uma regulação negativa do miR-17-5p. Neste mesmo modelo, através de experimentos de ganho e perda de função identificaram que a superexpressão do miR-17-5p promoveu aumento da neuroproteção dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais pela redução da apoptose causada pelo dano de exposição à PQ (Wang Qingqing *et al.*, 2018). Em modelo de hipóxia/isquemia cerebral foi mostrado que a expressão de miR-17 está associada a menores níveis de morte neuronal e área da lesão, assim como uma melhora na recuperação funcional (Ren *et al.*, 2020).

Tomados em conjunto, estes trabalhos demonstram o importante papel do miR-17 em diversos processos celulares, incluindo processos degenerativos no sistema nervoso. Esses dados apontam para o miR-17 como potencial alvo neuroprotetor em estratégias terapêuticas na neurodegeneração. No entanto, há a necessidade de mais estudos onde a modulação do miR-17 seja realizada em células específicas, já que os papéis desenvolvidos por este miRNA podem variar dependendo do tipo celular. Neste contexto, o uso de vetores virais como ferramenta de aplicação de terapia gênica experimental célula específica pode ser uma interessante estratégia.

1.7 Terapia gênica ocular e vetores de rAAV

A terapia gênica é uma técnica experimental de DNA recombinante que visa à introdução e expressão de material genético exógeno em células para fins terapêuticos (Linden & Matte, 2014). Ácidos nucleicos tais como DNA, mRNA, RNAs de interferência (siRNA), miRNA ou oligonucleotídeos antisense podem ser inseridos nas células do paciente promovendo alterações em seu material genético de forma transitória ou permanente (Daliri *et al.*, 2017). A transferência de genes tem se mostrado um tratamento promissor para diversas doenças oculares (Byrne *et al.*, 2014; Sengillo *et al.*, 2016).

As características anatômicas e fisiológicas do olho o torna um órgão particularmente adequado para intervenções de terapia gênica. O tamanho e a facilidade de acesso ao olho permitem de forma relativamente precisa a entrega de genes através de vetores em pequenos volumes (Ratican *et al.*, 2018); é um órgão imuno-privilegiado e a sua compartimentalização impede a disseminação do vetor administrado para demais partes do corpo (Daliri *et al.*,

2017). Além disso, é um órgão pareado, e o olho não tratado pode ser utilizado para controle interno e a sua transparência óptica permite uma avaliação do tratamento e progressão da doença através de técnicas não invasivas, tais como a oftalmoscopia, eletrorretinografia e tomografia de coerência óptica (Petit *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2017). No entanto, são poucos os testes de terapia gênica voltados para o glaucoma (Daliri *et al.*, 2017).

Recentemente, foi liberada pela *Food and Drug Administration* (FDA) a primeira terapia gênica ocular para a forma LCA2 da Amaurose Congênita de Leber humana, uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda visual grave na infância causada por uma mutação no gene da enzima RPE65 (Petit *et al.*, 2016). RPE65 codifica uma isomerase expressa principalmente no epitélio pigmentar da retina, responsável pela reciclagem do cromóforo visual. Tal mutação acarreta na formação defeituosa de cromóforos visuais implicando em mau funcionamento e degeneração dos fotorreceptores com consequente perda da visão (Moiseyev *et al.*, 2005). A terapia gênica empregada foi mediada pelo uso de vetores virais adeno-associados recombinantes (rAAV) contendo o gene terapêutico (Hauswirth *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008; Bainbridge *et al.*, 2008).

Em um estudo de fase 1/2 Meur *et al.*, (2018) avaliaram a segurança e eficácia da terapia gênica usando AAV2/4 em nove pacientes com amaurose congênita de Leber associada a deficiência do gene RPE65. As melhorias na função visual encontradas variaram entre os pacientes. Foi observada uma tendência de melhora da acuidade visual e do campo visual, além disso, a análise de OCT (tomografia de coerência óptica) não evidenciou afinamento da camada de fibras da retina (Meur *et al.*, 2018).

A atrofia muscular espinhal tipo 1 (AME1) é uma doença neuromuscular progressiva monogênica, caracterizada pela degeneração do neurônio motor devido a uma mutação no gene SMN1 (sobrevivência do neurônio motor 1), levando a fraqueza e atrofia muscular (Parente e Corti, 2018). Em um estudo de fase 3 quinze pacientes com AME1 receberam uma única dose intravenosa de vírus adeno-associado sorotipo 9 contendo a sequência para expressar a proteína SMN ausente. Foi encontrada entre os pacientes que receberam as injeções intravenosas do vetor viral de AAV9 uma maior sobrevida e uma melhora na realização de funções motoras (Mendell *et al.*, 2017).

Dos vários sistemas de vetores virais (lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados) e não virais (nanopartículas, dentre outros) atualmente empregados para a entrega de genes na retina, os vetores de rAAVs têm se mostrado os mais promissores nas abordagens terapêuticas para o glaucoma (Liu Xuyang *et al.*, 2009; Ratican *et al.*, 2018). O AAV é um vírus não envelopado de 25 nm composto por um genoma de fita simples de 4,7 kb, empacotado no

interior de um capsídeo icosaédrico. Existem diferentes sorotipos de vetores AAVs em função do tipo de proteína presente em seu capsídeo, onde o sorotipo irá determinar o tropismo celular e a eficiência de transdução do vetor (Ratican *et al.*, 2018). Por exemplo, o AAV5 transduz as células fotorreceptoras da retina, o AAV1 transduz principalmente o epitélio pigmentar da retina e o AAV2 é sorotipo mais eficiente para a transdução das CGRs. O AAV é um vírus incapaz de se replicar naturalmente, onde requer associação com o adenovírus para funções auxiliares. Além disso, é um vírus capaz de transduzir células diferenciadas e não diferenciadas (Liu Xuyang *et al.*, 2009).

O rAAV está entre os vetores mais comumente empregados em terapia gênica ocular. Isso se deve às características que o vetor apresenta, tais como: 1) baixa imunogenicidade e patogenicidade, devido ser um vírus não envelopado; 2) o material genético inserido permanece em uma forma episomal, sem integrar-se ao genoma do hospedeiro, apresentando baixo risco de mutação por inserção e 3) apresenta níveis longos e sustentados de expressão no núcleo da célula hospedeira (Chan *et al.*, 2017). No entanto, existem algumas limitações em relação ao uso dos vetores de AAVs, em particular sua capacidade de carga relativamente baixa de aproximadamente 4,5 kb, constituindo um problema na entrega de genes maiores (Ratican *et al.*, 2018).

Considerando as vantagens mencionadas quanto ao emprego dos vetores de rAAVs em terapia gênica ocular e o importante papel do miR-17 em diversos processos celulares do sistema nervoso e vias de sinalização neuroprotetoras e regenerativas, este trabalho pretende avaliar a eficácia da terapia gênica neuroprotetora e regenerativa em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneração, com foco no glaucoma, através da superexpressão do miR-17. Diante disso, hipotetizamos que a superexpressão do miR-17 em neurônios submetidos a lesão axonal é capaz de promover resposta neuroprotetora e regenerativa, podendo constituir promissora estratégia terapêutica para a neurodegeneração glaucomatosa.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Testar uma terapia gênica experimental neuroprotetora e regenerativa em modelos *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneração no SNC, com foco na neurodegeneração glaucomatosa, através da modulação da expressão do miR-17, utilizando vetor de rAAV.

2.2 Específicos

2.2.1 - Avaliar, em modelo *in vitro* de cultura primária neuronal, se a superexpressão do miR-17, utilizando vetor de rAAV, é capaz de induzir regeneração de neuritos após lesão do tipo “scratch”;

2.2.2 - Testar, em modelo *in vivo* de LNO em roedores, se a superexpressão do miR-17 em CGRs, utilizando vetor de rAAV, é capaz de promover neuroproteção das CGRs.

2.2.3 - Investigar os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos observados de neuroproteção e regeneração mediados pelo miR-17.

3. METODOLOGIA

3.1 Clonagem e produção dos vetores de vírus adeno-associado recombinante (rAAV)

Vetores de rAAV expressando miR-17 (rAAV.miR-17) e o vetor controle (rAAV.CTRL) foram clonados e produzidos em colaboração com o Prof. Uwe Michel (Universidade de Medicina de Göttingen, Alemanha). Ambos os vetores apresentam a sequência que codifica a expressão da proteína fluorescente mCherry sob controle do promotor sinapsina humana (hSyn) (Figura 6). A expressão da proteína mCherry é usada para identificar as células transduzidas pelos vetores. A expressão do miR-17 é controlada pelo promotor H1 (Figura 6). Tais sequências são flanqueadas por sequências repetidas terminais invertidas (ITR), necessárias para o reconhecimento de proteínas do capsídeo para a encapsulação do plasmídeo e são as únicas sequências do vírus selvagem que permanecem no construto do vetor de rAAV.

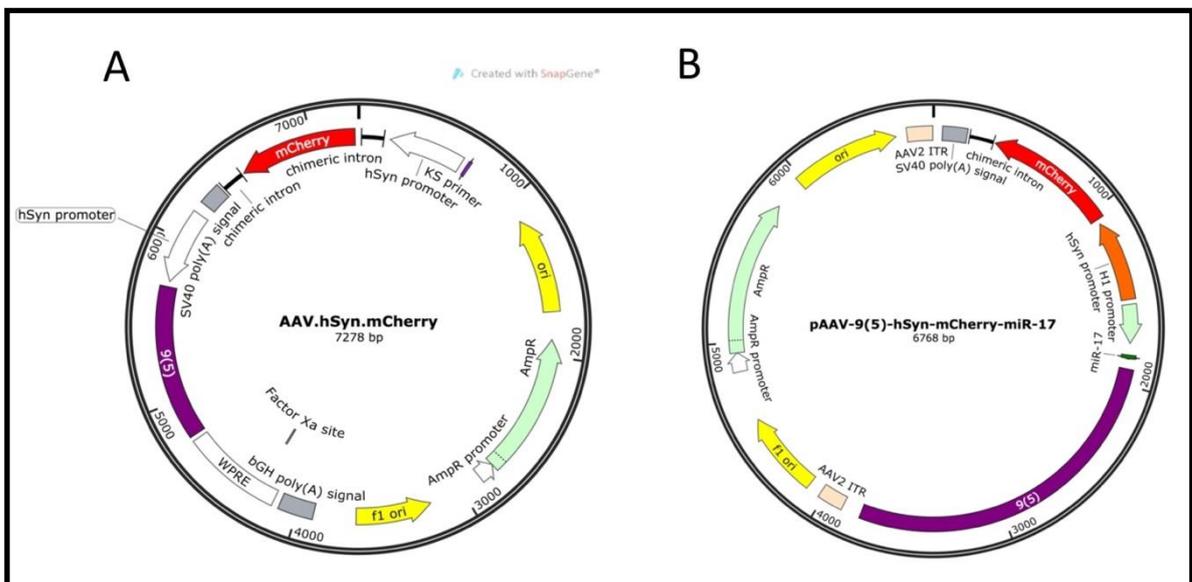


Figura 6 - Mapas dos vetores de rAAV. Mapas dos plasmídeos usados para produção do vetor controle, rAAV CTRL (A) e do vetor expressando o miR-17, rAAV.miR-17 (B). Ambos os vetores contêm a sequência codificadora da proteína fluorescente mCherry (vermelho), controlada pelo promotor hSyn.

Os vetores produzidos são do sorotipo 1/2mut, um vetor híbrido que apresenta proteínas do sorotipo 1 e 2 em seu capsídeo, sendo que a proteína tipo 2 apresenta mutações pontuais o que aumenta a eficiência de internalização do vetor pelas células a serem transduzidas (Zhong *et al.*, 2008).

Para a construção do vetor de rAAV foram necessários ainda outros dois plasmídeos, um plasmídeo chamado pHelper, contendo sequências de adenovírus necessárias para a replicação do rAAV, e um plasmídeo pAAV-RC que também contém sequências requeridas para a replicação do rAAV e sequências que codificam proteínas do capsídeo (Figura 7).

Foi realizada uma tripla transfecção em células de rim imortalizadas (HEK0293), através de precipitação dos plasmídeos (proporção molar de 0,5: 1: 1) com fosfato de cálcio e solução salina tamponada com HEPES sobre a superfície da célula. No núcleo da célula ocorre a replicação do genoma a ser incorporado pelo vetor e a tradução de proteínas necessárias para a montagem do capsídeo.

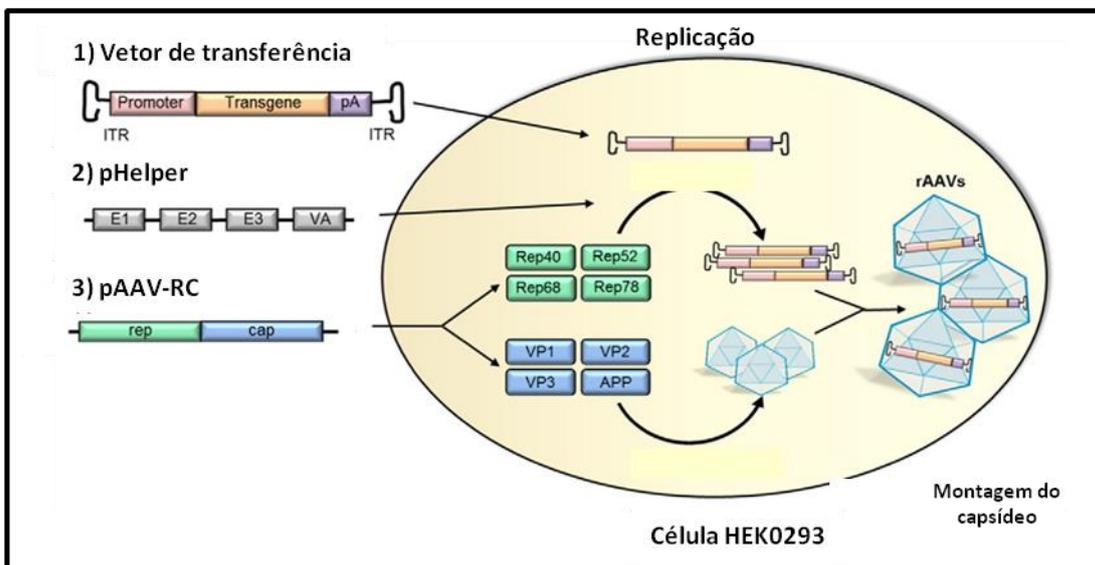


Figura 7 - Produção de vetores de rAAV. 1) Vetor de transferência, contendo um promotor, um transgene e uma poli-adenilação flaqueadas por duas sequências repetidas terminais invertidas (ITR), as duas únicas sequências do vírus AAV selvagem presente no plasmídeo. 2) Plasmídeo auxiliar (pHelper), contendo as regiões adenovirais E1, E2, E3 e VA necessárias para a replicação do vetor de transferência. 3) pAAV-RC, um plasmídeo contendo os genes rep e cap, sequências requeridas para a produção de proteínas que medeiam a replicação do vetor de transferência e proteínas envolvidas com a formação do capsídeo viral, respectivamente. Adaptado de Saraiva *et al.*, 2016.

Três dias após a transfecção, foram feitas sucessivas etapas de congelamento/descongelamento para promover a lise das células e deste modo obter os vetores de rAAV. Os vetores de rAAV foram purificados por centrifugação em gradiente de iodixanol que permitiu a separação entre os componentes do lisado e o vetor produzido. Finalmente, para obter um maior grau de pureza, foi feita ainda uma cromatografia líquida em coluna de heparina, onde as proteínas do capsídeo se ligam as essas moléculas e podem assim ser separados através de uma corrida com o eluente de cloreto de sódio 0,5 M. Posteriormente é feita uma diálise para retirada da elevada concentração de sal utilizada. O vetor de rAAV foi produzido em larga escala, com um elevado título ($1,3 \times 10^8$ partículas/ μL) e grau de pureza.

3.2 Modelo in vitro de cultura primária de neurônios corticais

A cultura primária de neurônios corticais foi preparada usando ratos da linhagem *Wistar* com 18 dias embrionário (E18). As ratas fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO_2 (Protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG - CEUA: 237/2018). Resumidamente, o córtex foi dissecado, incubado com tripsina (0,25%) por 10 min a 37°C . O tecido foi centrifugado a 800 rpm, 4°C por 4 min, o sobrenadante descartado e o pellet contendo o tecido foi ressuscitado em soro fetal bovino 5%. Então, o tecido foi dissociado usando uma pipeta pauster customizada. Em seguida foi feita mais uma centrifugação a 800 rpm, 4°C por 4 min e os neurônios foram ressuscitados em meio de cultura Neurobasal suplementado com B-27, L-Glutamina e Penicilina/Estreptomicina/Neomicina. Os neurônios foram plaqueados em lamínulas de vidro em placas de cultura cujas superfícies foram previamente cobertas com poli-L-ornitina e laminina nas concentrações de $1000 \mu\text{g/mL}$ e $1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

3.3 Teste da eficiência de transdução dos vetores virais in vitro

Para avaliar a eficiência de transdução dos vetores de rAAV, os neurônios foram plaqueados em uma placa de 24 poços. Após 4 h do plaqueamento, os vetores de rAAV foram adicionados em diferentes títulos em cada poço. Foram testadas o títulos de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 partículas virais/poço. Então, a cada dia foi quantificado o número total de células, visualizadas através de microscopia de contraste de fase, e o número de células expressando mCherry, visualizada por microscopia de fluorescência (Zeiss, Axiovert) até o dia in vitro 8 (DIV8).

3.4 Regeneração de neuritos in vitro

Para os experimentos de regeneração de neuritos os neurônios foram plaqueados em lamínulas de vidro em uma placa de 24 poços. Após 4 h do plaqueamento, os vetores de rAAV foram adicionados com um título de 5×10^6 partículas virais/poço, escolhido

previamente na análise anterior. Então, uma lesão do tipo “*scratch*” foi realizada com uma ponteira de pipeta no DIV7 e 24 horas após a lesão as células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato salina (PBS). As lamínulas foram montadas em meio de montagem com p-Fenilenodiamina (PPD) (5mM em 90% de glicerol e 10% de PBS) em lâminas de vidro. Foram feitas 5 imagens de cada poço em um microscópio de fluorescência ApoTome.2 (Zeiss) na objetiva de 20x do Centro de Aquisição e Processamento de Imagem (CAPI). Foi empregado o *software* ImageJ (plugin NeuronJ) para as quantificações. As quantificações foram feitas pelo somatório do comprimento total dos neuritos a uma distância entre 100 e 200 μm da borda da lesão dividido pelo número de células localizadas da borda da lesão até 100 μm antes da lesão. Deste modo foi feita uma normalização para se evitar um viés na análise por uma variação do número de células. Além disso, as quantificações foram feitas às cegas.

3.5 Injeções intravítrea de rAAV

Ratos *Wistar* adultos (200-300 g) (Protocolo CEUA: 4/2017) foram empregados em todos os experimentos in vivo. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia profunda com 10% de cetamina (95 mg/kg de peso corporal) e 2% de xilazina (7 mg/kg de peso corporal) injetados por via intraperitoneal. Inicialmente os animais foram anestesiados e 4 μl de uma solução contendo os vetores rAAV foi injetada no vítreo através de uma incisão na região perilímbica, utilizando uma seringa Hamilton de 10 μL , de modo a transduzir as CGR. Após a injeção, foi colocada uma solução de vaselina nos olhos para evitar ressecamento e os animais foram acompanhados até a recuperação.

3.6 Injeções estereotáxicas

Para marcar as CGRs retrogradamente, três semanas após a injeção dos vetores de rAAV, foram realizadas injeções estereotáxicas de FluoroGold no colículo superior como descrito anteriormente (Ribas *et al.*, 2017). Devidamente anestesiado, o animal teve seu crânio exposto por uma incisão na linha média da pele. Foram feitos dois pequenos orifícios no crânio a fim de se alcançar a região do colículo superior: em 6,5 mm posterior ao bregma e 1,8 mm lateral à linha média em ambos os lados. Um capilar de vidro acoplado a uma seringa Hamilton, que por sua vez estava acoplada a uma bomba de infusão foram usadas para injetar 2 μl de FluoroGold 4% (Life Technologies) a uma taxa de 500 nL/min durante 4 minutos a uma profundidade de 3,2 mm dentro do cérebro. Após a injeção, o capilar de vidro foi deixado no local durante 5 minutos permitindo assim uma maior difusão do FluoroGold para além do local da injeção. O capilar foi removido, o crânio exposto foi fechado e os animais monitorados, onde receberam os devidos cuidados pós-cirúrgicos até acordarem da anestesia.

Tais cuidados consistiram em uma aplicação subcutânea de soro fisiológico (5 mL) e uma dose intraperitoneal do analgésico Cloridrato de Tramadol (5mg/Kg) duas vezes ao dia por 3 dias.

3.7 Esmagamento do nervo óptico

Modelo de LNO do tipo esmagamento foi empregado para testar a eficiência da terapia gênica neuroprotetora e regenerativa. Quatro semanas após a injeção dos vetores de rAAV (uma semana após as injeções de FluoroGold) foi feita a LNO como descrito anteriormente (Ribas *et al.*, 2017). Para tal, foi feita uma incisão próximo a borda orbital, a órbita foi exposta, a glândula lacrimal foi deslocada para frente e o músculo reto superior liberado do seu ponto de inserção deixando parte do NO exposto para a realização da lesão. Um fio de sutura (10.0 - Ethicon) foi constringido ao redor do NO durante 30 segundos, à cerca de 2 mm de sua inserção no globo ocular. Em seguida, a sutura foi removida, a pele foi suturada e os animais monitorados, onde receberam os mesmos cuidados pós-operatórios descritos acima.

3.8 Análise da sobrevivência das células ganglionares da retina

Quatro semanas após o esmagamento do NO foi feita a eutanásia dos animais. Os animais foram perfundidos transcardialmente com 250 mL de PBS, seguidos por 250 mL de PFA 4% em PBS. Posteriormente o NO e o globo ocular foram removidos e pós-fixados em PFA 4% por cerca de 2h. As retinas foram dissecadas e feita sua montagem plana em lâminas de vidro e armazenadas a 4°C para posterior quantificação. Imagens da retina interna foram feitas utilizando um microscópio de fluorescência ApoTome.2 (Zeiss) na objetiva de 20x, conforme descrito anteriormente (Ribas *et al.*, 2017). Para cada animal foram feitas imagens de três regiões da retina em relação ao disco óptico: centro, região intermediária e periferia, com um total de 4 imagens por região por retina.

Foi feita a contagem das CGRs sobreviventes, marcadas com FluoroGold. A distinção entre as CGRs e as demais células gliais presentes na retina (microglia) também positivas para o FluoroGold, foi feita segundo critérios morfológicos (tamanho e formato do soma, forma dos prolongamentos).

3.9 Análise do nervo óptico

Para as análises do NO foram feitos cortes longitudinais (16 µm) em criostato. Os nervos foram analisados pela fluorescência de mCherry nos axônios e também imunomarcados com diferentes anticorpos (descrito abaixo). Imagens de microscopia de fluorescência foram realizadas no microscópio ApoTome.2 (Zeiss) na objetiva de 20x.

3.10 Imunohistoquímica

Imunomarcações contra as proteínas Iba1, neurofilamento H (SMI32) e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foram realizadas em cortes de NO. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6. Posteriormente, foram permeabilizados com Tween 20 a 0,05% e Triton X-100 a 0,3% em PBS, durante 15 minutos, e incubados com solução de bloqueio (NGS 10%; BSA 1%; Triton X-100 0,3% em PBS 1x) à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, os cortes de NO foram incubados à 4° C durante a noite com os respectivos anticorpos primários (GFAP, 1:100, Cell Signaling); (anti-Iba1, 1:100, Dako) e (SMI32, 1:100, Abcam) devidamente diluídos na mesma solução de bloqueio empregada. Para a detecção de SMI32 os cortes de NO foram incubados com anticorpo secundário Alexa 488 *goat anti-mouse* (1:1000, ThermoFisher) e para detecção de GFAP e Iba1 foi usado o anticorpo secundário Alexa 488 *goat anti-rabbit* (1:1000, ThermoFisher) durante 1 hora à temperatura ambiente. A contra coloração foi realizada com DAPI (Sigma) para marcação dos núcleos e as lâminas foram montadas com PPD e armazenadas à -20°C.

3.11 Análise de bioinformática dos alvos do miR-17

Para analisar os mecanismos pelos quais o miR-17 pode interferir na neuroproteção e regeneração axonal, foi feita uma análise de bioinformática dos mRNAs alvos do miR-17. Foi usada a plataforma miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) para identificar os alvos preditos do miR-17. Foram considerados apenas os alvos preditos que foram detectados por dois algoritmos diferentes (TargetScan e miRDB). A plataforma miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) foi utilizada para identificar os mRNAs alvos validados do miR-17 e foram considerados apenas os alvos com alto grau de evidência.

Análises funcionais foram realizadas apenas com os alvos preditos usando a plataforma ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). Usando esta plataforma foram feitas análises de ontologia gênica para separar os alvos preditos do miR-17 em diferentes classes de genes, agrupados em processos biológicos, funções moleculares, localização sub-celular e na via de KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto).

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism (versão 7). Todos os dados experimentais foram agrupados em média \pm erro padrão da média. As diferenças entre esses valores médios foram analisadas pelo teste T de Student ou teste T “one sample”. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Eficiência da transdução em cultura de neurônios corticais

Vetores de rAAV previamente construídos foram empregados para superexpressar o miR-17 (rAAV.miR-17) em conjunto com a proteína fluorescente mCherry em cultura primária de neurônios corticais de ratos *Wistar* E18. Vetores virais expressando apenas a proteína fluorescente mCherry foram utilizados como controle (rAAV.CTRL). Após a transdução das culturas com os vetores rAAV.miR-17 ou rAAV.CTRL as células foram observadas diariamente por microscopia de contraste de fase e fluorescência até o DIV8 (Figura 8).

Os resultados de transdução dos vetores virais mostraram que rAAV.miR-17 (Figura 8) e rAAV.CTRL (não mostrado) são capazes de transduzir eficientemente os neurônios corticais *in vitro*. Diferentes títulos do vetor foram testados (dados não mostrados), e o título correspondente a 5×10^6 partículas virais/poço apresentou o melhor resultado de transdução, com aproximadamente 90% das células transduzidas no DIV8, e sem apresentar toxicidade para as células (Figura 8).

A

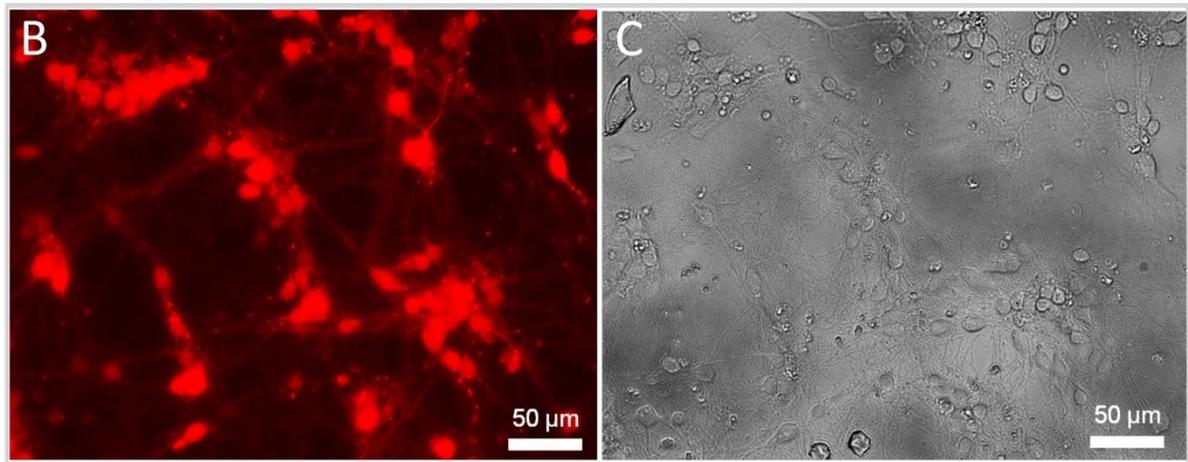
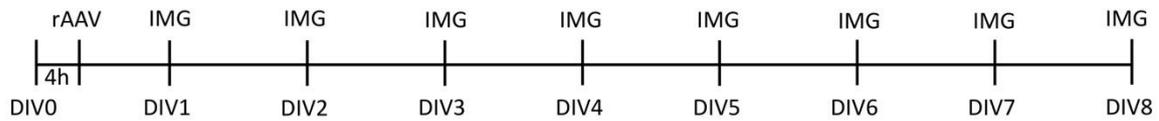


Figura 8 - Teste de transdução do vetor rAAV.miR-17 em cultura primária de neurônios corticais. A. Esquema do desenho experimental. DIV: dia in vitro; rAAV: dia da transdução com os vetores de rAAV; IMG: imagens para quantificação. B. Fotomicrografia por microscopia de fluorescência de neurônios corticais primários expressando a proteína fluorescente mCherry em vermelho. C. Mesmo campo mostrando os neurônios corticais primários em contraste de fase.

4.2 rAAV.miR-17 aumenta a regeneração de neuritos *in vitro*

Uma vez confirmada a eficiência de transdução dos vetores de rAAV, foi analisada a capacidade do miR-17 em promover regeneração de neuritos *in vitro*. Para isso, neurônios corticais primários foram transduzidos com os vetores virais, rAAV CTRL ou rAAV.miR-17, e após 7 dias foi realizada uma lesão do tipo “scratch”. Após 24 h da lesão as culturas foram fixadas e imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência para avaliar a expressão de mCherry nos neurônios, incluindo os corpos celulares e neuritos (Figura 9A). Foi observada uma maior densidade de neuritos regenerados na área da lesão nos poços transduzidos com o vetores rAAV.miR-17 em comparação ao vetor controle rAAV CTRL (Figura 9B). A quantificação mostrou um aumento estatisticamente significativo de 208 % ± 19 no tamanho dos neuritos (Figura 9C). Outro parâmetro analisado foi o número de neuritos capazes de cruzar a linha de 200 µm de distância da lesão (Figura 9D), que não teve uma diferença estatisticamente significativa. Os resultados mostram que o miR-17 foi capaz de aumentar a regeneração de neuritos *in vitro*.

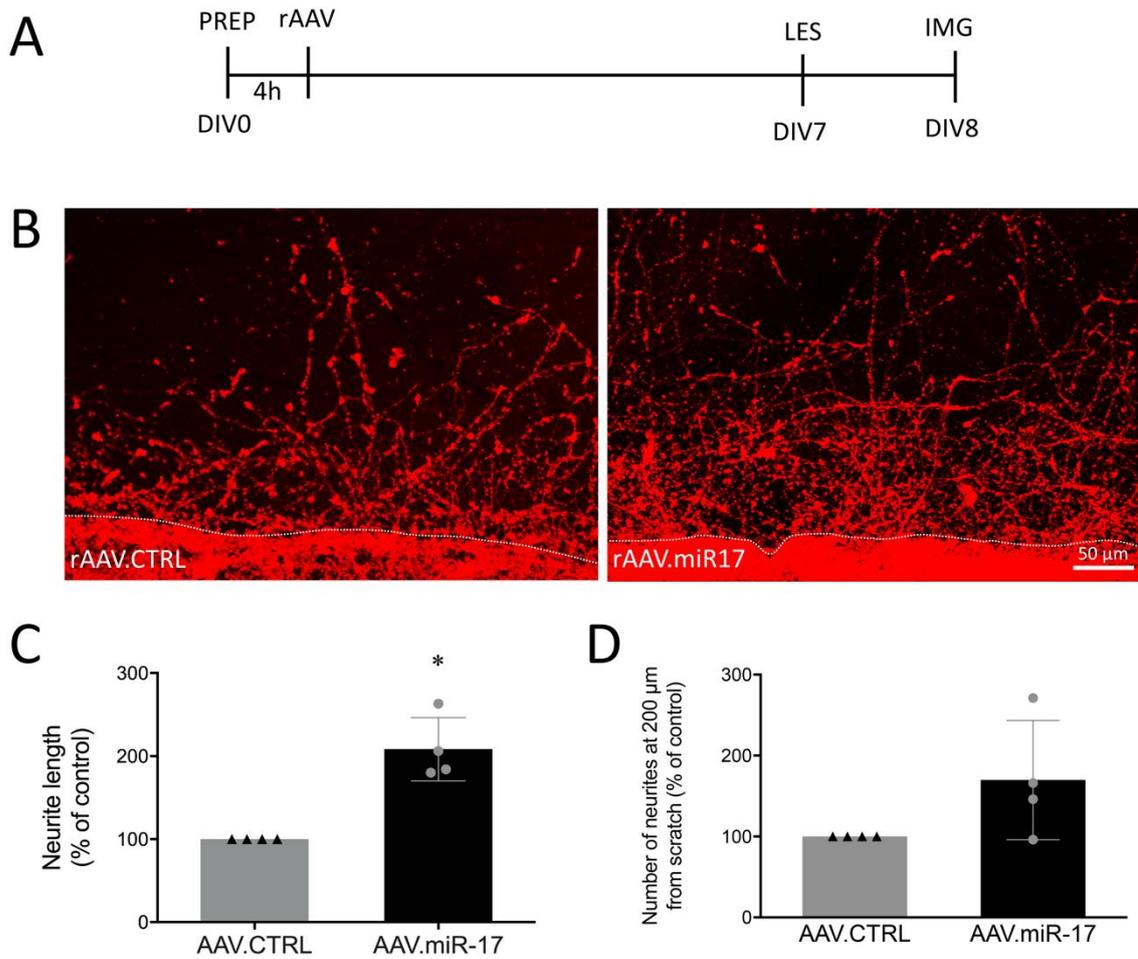


Figura 9 - Regeneração de neuritos *in vitro* após transdução com os vetores rAAV.mCherry e rAAV.miR-17. **A.** Desenho experimental. A cultura foi preparada (PREP) e 4 h após foi transduzida com os vetores virais (rAAV). No DIV7 foi feita uma lesão tipo “scratch” (LES) e 24 h após (DIV8) foram feitas as imagens (IMG). **B.** Fotomicrografias de fluorescência mostrando a expressão de mCherry (vermelho) nos neuritos em regeneração (parte superior) e a borda da lesão (linha tracejada). **C.** Quantificação no tamanho dos neuritos a uma distância entre 100 μm e 200 μm da borda da lesão, normalizado pelo controle. **D.** Número de neuritos que cruzaram a linha de 200 μm da borda da lesão, normalizado pelo controle. Dados representados como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram analisadas pelo teste T “one sample”. N = 4; * P < 0.05

4.3 Eficiência da transdução *in vivo*

Posteriormente foi realizado um teste da eficiência dos vetores rAAV.miR-17 (Figuras 10 e 11) e rAAV CTRL (não mostrado) em transduzir *in vivo* as CGRs. Os vetores foram injetados no vítreo de ratos *Wistar* adultos e, após quatro semanas, os animais foram eutanasiados, a retina dissecada e feita a sua montagem plana. Por imagens de microscopia de fluorescência foi possível verificar que ocorreu uma eficiente transdução das CGRs, com seus corpos celulares e axônios expressando a proteína fluorescente mCherry (Figuras 10 e 11).

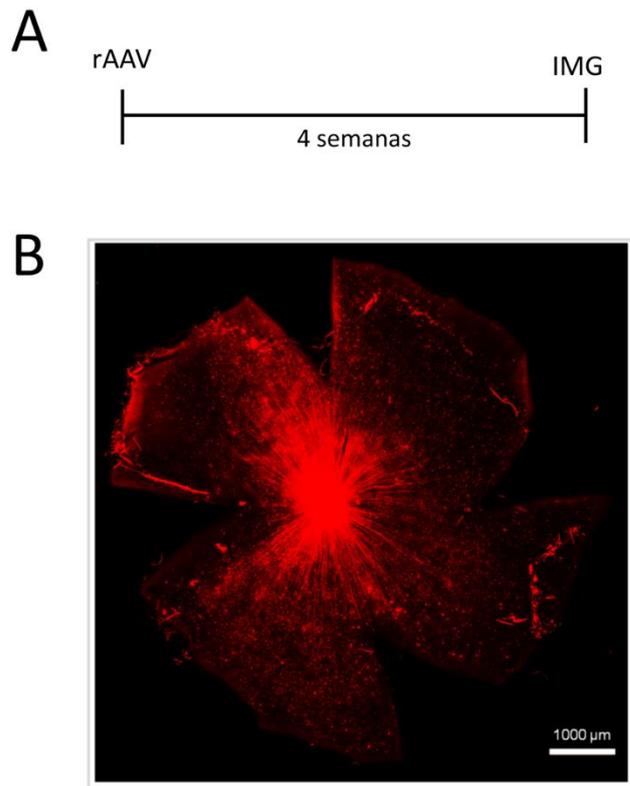


Figura 10 - Teste de transdução do vetor rAAV.miR-17 na retina in vivo. **A.** Esquema do desenho experimental. rAAV: dia da injeção intravítrea com os vetores de rAAV; IMG: perfusão, montagem plana e imagem. **B.** Fotomicrografia por microscopia de fluorescência da montagem plana da retina após transdução com o vetor rAAV.miR-17. Em vermelho corpos das CGRs e seus axônios expressando a proteína fluorescente mCherry. A imagem foi produzida através da compilação de dezenas de fotomicrografias obtidas na objetiva de 10x.

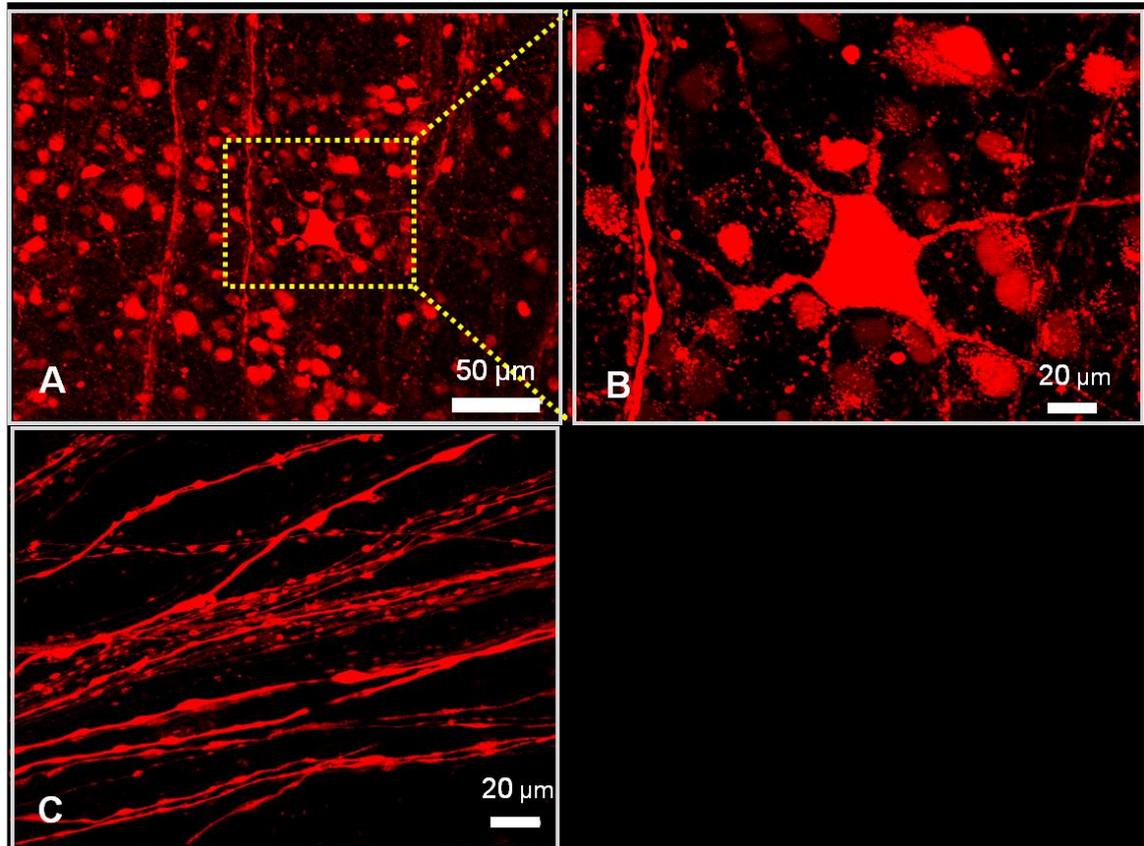


Figura 11 - **A** e **B**. Fotomicrografias por microscopia de fluorescência da montagem plana da retina após transdução com o vetor rAAV.miR-17 em menos (**A**) e maior (**B**) aumento mostrando as CGRs expressando a proteína fluorescente mCherry (**B** maior aumento da área demarcada em **A**). **C**. Camada de fibras nervosas da retina mostrando a expressão da proteína fluorescente mCherry nos axônios das CGRs.

4.4 Análise de sobrevivência das células ganglionares da retina

Para avaliar a sobrevivência das CGRs, foi feita a injeção no vítreo dos vetores de rAAV, 3 semanas após foi feita a injeção estereotáxica no colículo superior do traçador retrógrado FluoroGold. Após 1 semana foi feita a LNO e 4 semanas depois foi feita a eutanásia (Figura 12A). A quantificação das CGRs marcadas com o traçador retrógrado FluoroGold foi realizada em três diferentes regiões da retina, centro (1/6 do raio da retina), região intermediária (3/6 do raio) e periferia (5/6 do raio) em relação ao disco óptico. Em animais não lesados, a densidade de CGRs é maior na região central e diminui progressivamente nas regiões intermediárias e periféricas (Figura 12B – não lesado). A LNO induz uma clara diminuição do número de CGRs positivas para FluoroGold, quando comparado a retinas não lesadas (Figura 12B – rAAV.CTRL x não lesado). A transdução com o vetor rAAV.miR-17 aumenta o número de CGRs, quando comparado ao vetor controle rAAV.CTRL (Figura 12B – rAAV.miR-17 x rAAV.CTRL). A quantificação mostra um aumento significativo no número de CGRs positivas para FluoroGold nas três regiões analisadas, centro (rAAV.miR-17: $26 \pm 1,5$ x rAAV.CTRL: $6 \pm 0,7$), intermediária (rAAV.miR-17: $30 \pm 1,3$ x rAAV.CTRL: $7 \pm 1,2$) e periferia (rAAV.miR-17: $16 \pm 1,8$ x rAAV.CTRL: $5 \pm 0,7$), assim como na médias das três regiões (rAAV.miR-17: $24 \pm 1,4$ x rAAV.CTRL: $6 \pm 0,7$) (Figura 12C). Os resultados mostram que o miR-17 é capaz de aumentar a sobrevivência das CGRs após LNO.

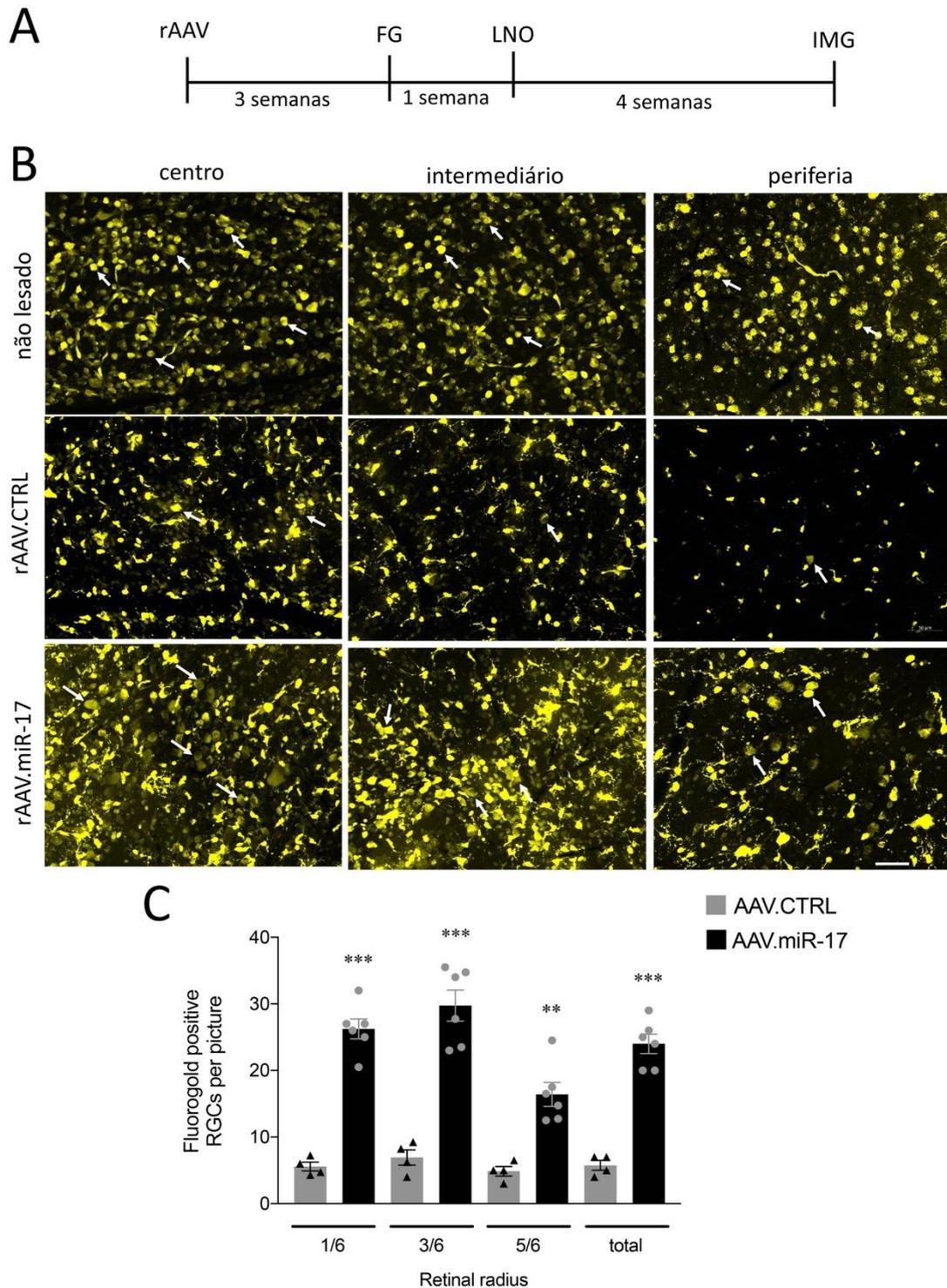


Figura 12 - Análise da sobrevivência das CGRs. **A.** Desenho experimental. Injeções intravítreas dos vetores (rAAV) foram realizadas e 3 semanas após os animais foram submetidos à injeções estereotáxicas de FluoroGold no colículo superior (FG). Após uma semana foi feita uma lesão do nervo óptico (LNO) do tipo esmagamento e 4 semanas após foram feitas as imagens (IMG). **B.** Fotomicrografias de fluorescência mostrando as CGRs positivas para o FluoroGold (verde) em três diferentes regiões da retina interna (centro, intermediário e periferia em relação ao disco óptico) dos

três grupos analisados (não lesado; rAAV CTRL e rAAV.miR-17). Barra de escala 50 μ m. C. Quantificação das CGRs positivas para o FluoroGold em três diferentes regiões da retina representadas pelo raio da retina em relação ao disco óptico. Dados representados como média \pm erro padrão da média. N = 4 (rAAV CTRL); N = 6 (rAAV.miR-17); * P < 0.05

4.5 Análise do nervo óptico

Além de avaliar a degeneração dos corpos celulares das CGRs, foi feita também uma análise do NO. Primeiramente avaliamos a região proximal do NO em relação à lesão (Figura 13), bem como a região distal (Figura 14). Foi encontrada maior marcação de axônios nestas duas regiões do NO, que pode ser observada pela expressão nos axônios de mCherry (vermelho) e pela marcação para neurofilamento H (SMI32 - verde). Além disso, foi possível identificar mais axônios íntegros na região distal no grupo rAAV.miR-17 (Figura 14). Esses resultados sugerem uma maior presença de axônios no nervo óptico no grupo rAAV.miR-17 nas duas regiões.

Avaliamos ainda a presença de astrócitos na região distal do nervo óptico pela marcação para GFAP (verde) (Figura 15), além da análise de microglia ativada pela marcação contra Iba1 (verde) (Figura 16). Não foi encontrada alteração na marcação de astrócitos e microglia na região do NO analisada.

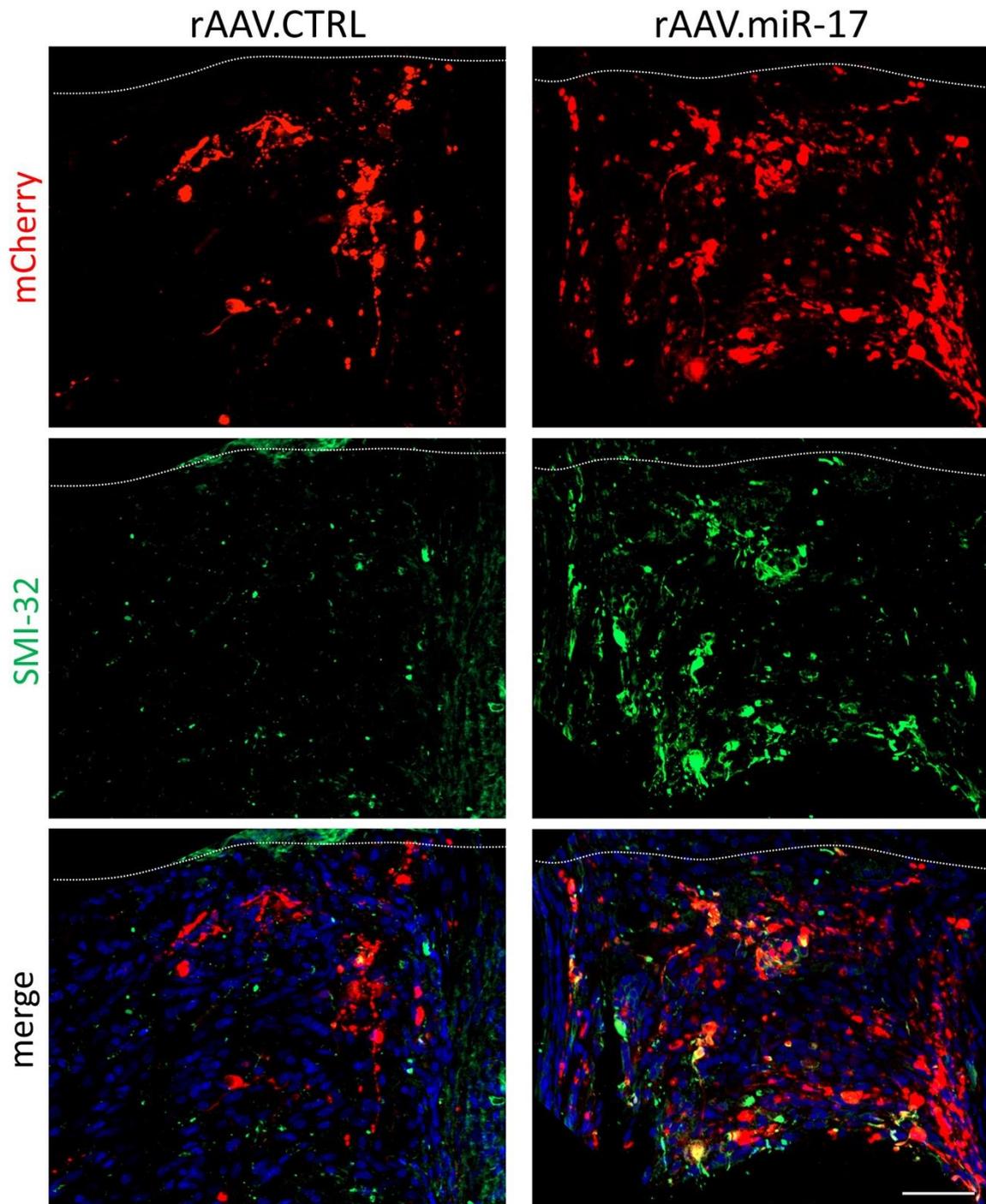


Figura 13 - Análise da região proximal do nervo óptico. Fotomicrografias mostrando a região proximal do nervo óptico em relação a lesão (linha tracejada) nos grupos rAAV CTRL e rAAV miR-17. Axônios no nervo óptico expressando mCherry (vermelho) e marcação com anticorpo contra neurofilamento H (SMI32 – verde). Sobreposição das imagens (merge), incluindo a marcação para DAPI (azul). Barra de escala 50 μ m

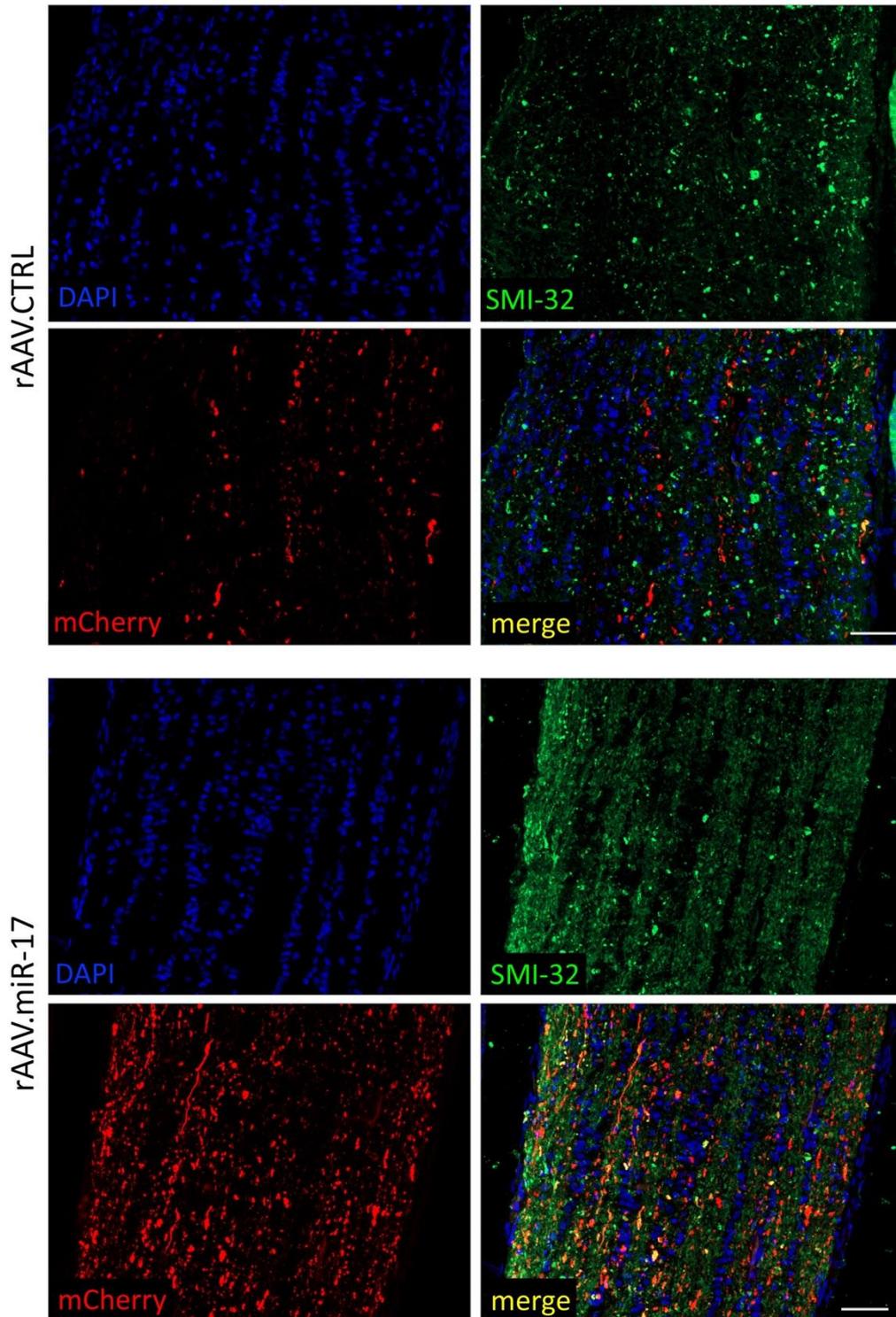


Figura 14 - Análise da região distal do nervo óptico. Fotomicrografias mostrando a região distal do nervo óptico em relação a lesão nos grupos rAAV.CTRL e rAAV.miR-17. Axônios no nervo óptico expressando mCherry (vermelho) e marcação com anticorpo contra neurofilamento H (SMI-32 – verde). Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul). Sobreposição das imagens (merge). Barra de escala 50 μ m.

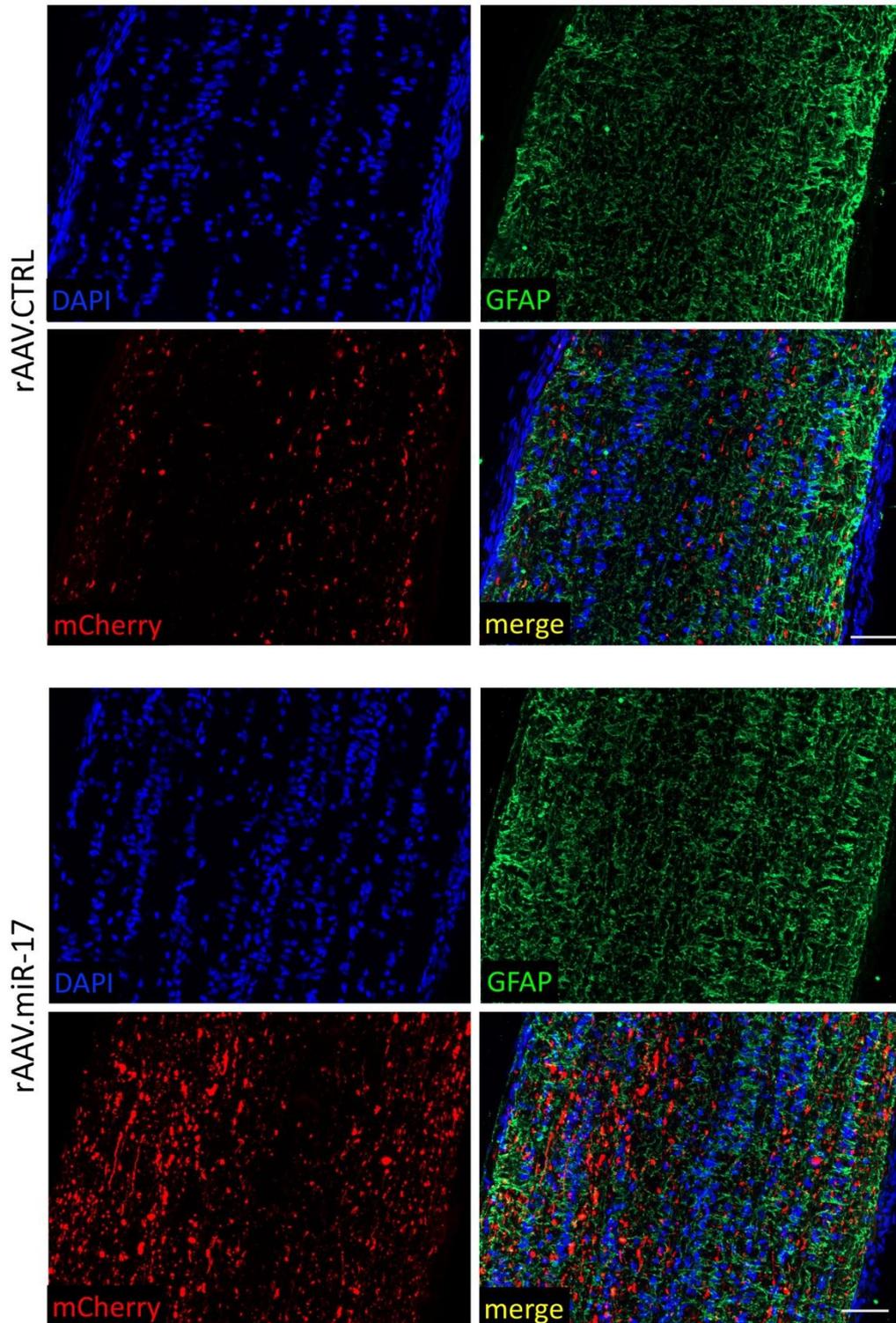


Figura 15 - Análise dos astrócitos na região distal do nervo óptico. Fotomicrografias mostrando a região distal do nervo óptico em relação a lesão nos grupos rAAV CTRL e rAAV.miR-17. Axônios no nervo óptico expressando mCherry (vermelho). Astrócitos marcados com anticorpo contra GFAP (verde). Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul). Sobreposição das imagens (merge). Barra de escala 50 μ m.

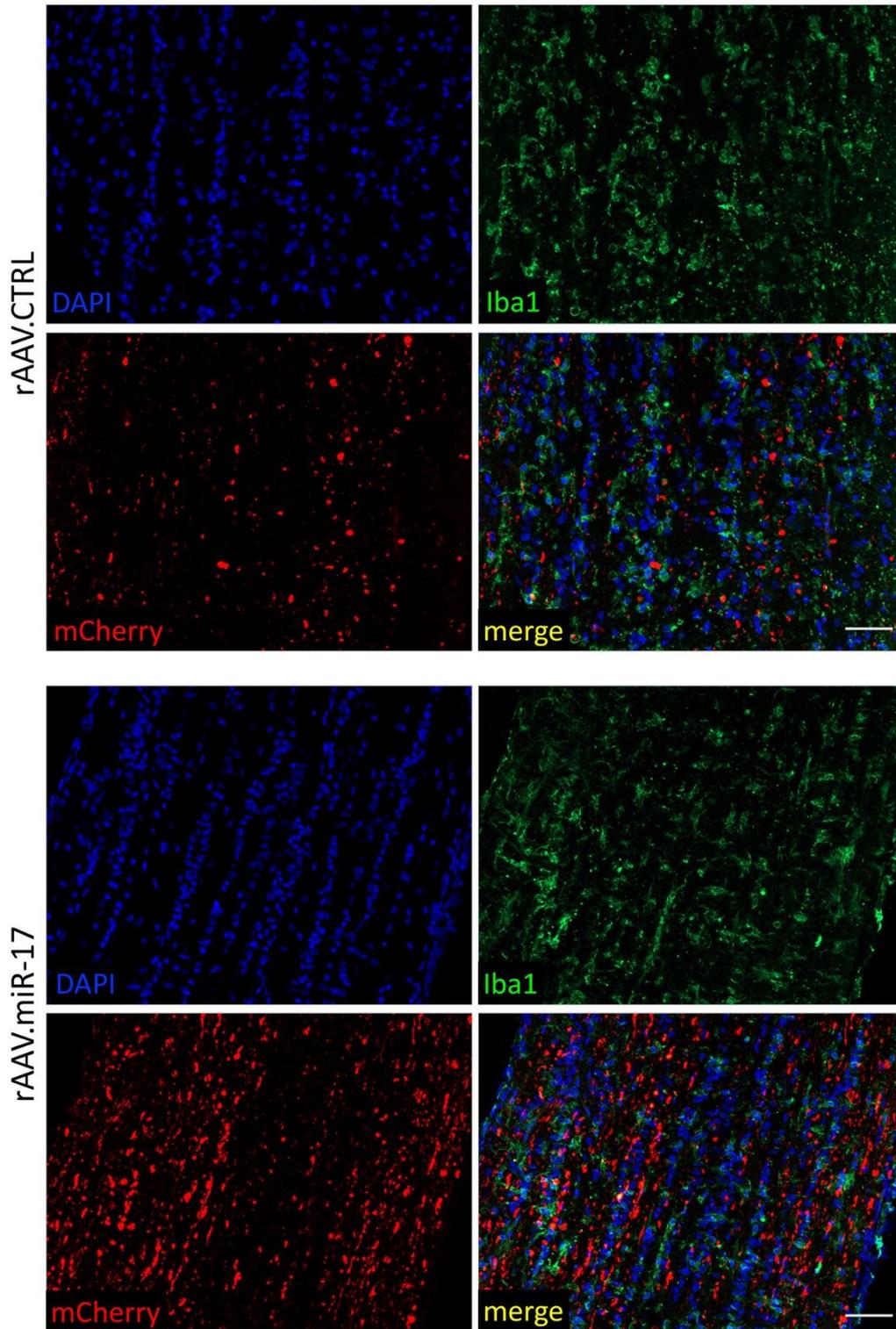


Figura 16 - Análise das micróglia na região distal do nervo óptico. Fotomicrografias mostrando a região distal do nervo óptico em relação a lesão nos grupos rAAV CTRL e rAAV.miR-17. Axônios no nervo óptico expressando mCherry (vermelho). Micróglia marcados com anticorpo contra Iba1 (verde). Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul). Sobreposição das imagens (merge). Barra de escala 50 μ m

4.6 Análise de bioinformática dos alvos do miR-17

Para avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o miR-17 exerce seus efeitos, foi realizada uma análise de bioinformática usando diferentes plataformas. Primeiramente foi utilizada a plataforma miRWalk para identificar os genes alvos humanos preditos do miR-17, e a plataforma miRTarBase permitiu identificar os genes alvos validados do miR-17. Um total de 245 genes alvos preditos do miR-17 foram identificados, sendo destes 105 genes já validados e 140 genes não validados (Figura 17A). A mesma plataforma miRWalk permitiu ainda quantificar a distribuição dos genes alvos preditos nos cromossomos (Figura 17B). Foi observado que os alvos do miR-17 estão distribuídos em todos os cromossomos humanos.

Análises funcionais de ontologia gênica dos genes alvos preditos do miR-17 foram realizadas usando a plataforma ShinyGO (Figura 18). Os genes alvos preditos do miR-17 foram categorizados em diferentes classes de genes, com a identificação da localização sub-celular (Figura 18A), processos biológicos (Figura 18B), funções moleculares (Figura 18C) e os genes mais enriquecidos na via de KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto) (Figura 18D). Com relação a localização sub-celular dos produtos dos genes, foi observado o enriquecimento de genes cujos produtos se localizam em projeções neuronais, axônios, dendritos e em complexos de fatores de transcrição (Figura 18A). Dentre os processos biológicos e funções moleculares enriquecidos, foram encontrados genes envolvidos com o controle da expressão gênica (Figura 18B-C). Na análise da via de KEGG, foi observado o enriquecimento de genes envolvidos com a via das MAPK, PI3K/Akt, TNF e orientação axonal (Figura 18D). Dentre os genes alvos do miR-17, destacamos alguns envolvidos com os processos de morte celular, crescimento neurítico, degeneração e regeneração axonal (Tabela 1).

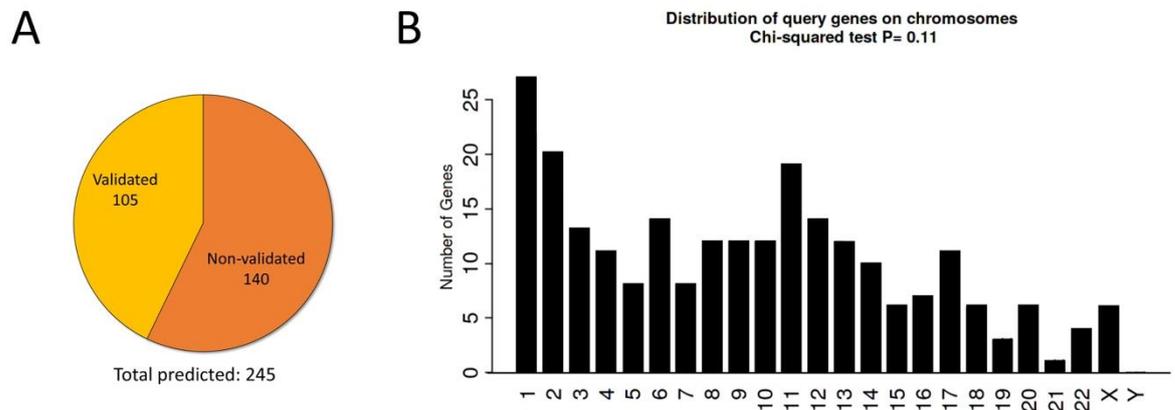


Figura 17 - Análise dos genes alvos preditos do miR-17. **A.** Número de genes alvos preditos totais, validados e ainda não validados. **B.** Análise do número de genes alvos preditos presentes em cada cromossomo.

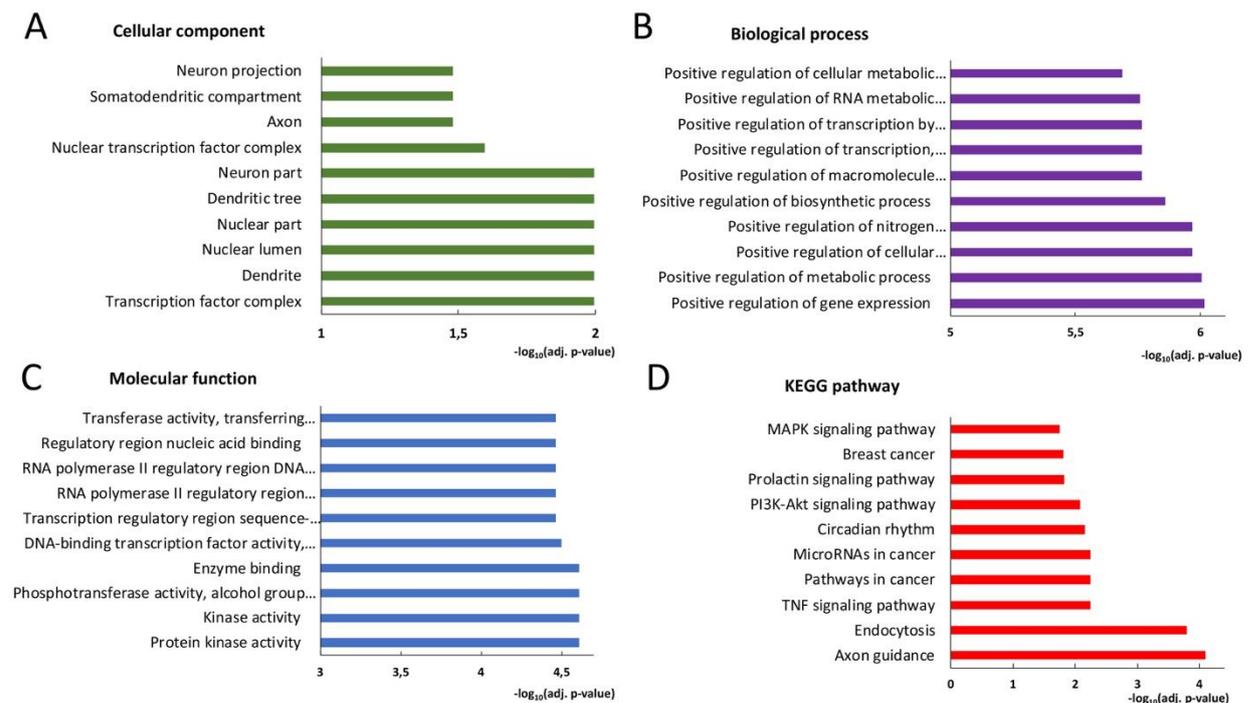


Figura 18 - Análises funcionais dos genes alvos preditos do miR-17. Gráficos de análise de ontologia gênica dos alvos preditos mostrando os 10 compartimentos celulares (A), processos

biológicos (B), funções moleculares (C) e a via KEGG (D) mais enriquecidos.

GENE	FUNCTION	REFERENCE
<i>CRMP5</i>	Inhitis neurite outgrowth	Brot et al., 2010
<i>RGMa</i>	Inhitis axon outgrowth	Wang et al., 2013
<i>EphA5</i>	Inhitis neurite outgrowth	Wang et al., 2016
<i>KLF9</i>	Inhibits axon regeneration	Trakhtenberg et al., 2018
<i>ROCK2</i>	Inhibits axon regeneration	Koch et al., 2014
<i>E2F3</i>	Facilitaes neuronal death	Iyirhiaro et al., 2014
<i>TP53INP1</i>	Promotes cell death	Seillier et al., 2012
<i>ZNF238</i>	Promotes cell death	Tatard et al., 2010
<i>NCOA3</i>	Hyperstimulation induces cell death	Hossain et al., 2018
<i>MLK1</i>	Signaling pathway promotes axon degeneration	Yang et al., 2015

Tabela 1 - Genes alvos preditos do miR-17 selecionados com papéis em morte celular, crescimento neurítico, degeneração e regeneração axonal.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido diante da necessidade de novas estratégias neuroprotetoras e regenerativas para o tratamento do glaucoma, uma vez que as abordagens farmacológicas atuais disponíveis não abrange todo o grupo de pacientes, como por exemplo, aqueles pacientes cujo controle da PIO não é capaz de frear a progressão da doença. Ademais, as abordagens farmacológicas tradicionais podem muitas das vezes, apresentar-se incompletas, com efeitos colaterais significativos, necessitar de tratamentos repetidos, além dos problemas relacionados ao correto tratamento e adesão dos pacientes.

Diante disso, este trabalho identificou que a terapia gênica neuroprotetora e regenerativa para a neurodegeneração glaucomatosa pela superexpressão do miR-17 foi capaz de promover crescimento neurítico significativo em neurônios corticais *in vitro*, promover neuroproteção das CGRs *in vivo* após LNO por esmagamento, bem como neuroproteção axonal das regiões proximal e distal à lesão. Análises de bioinformática realizadas em diferentes plataformas permitiu identificar vários genes alvos preditos do miR-17 que participam de vias de sinalização e diferentes processos biológicos e moleculares envolvidos com os processos de morte celular, regeneração e degeneração axonal.

5.1 Transferência gênica mediada por vetores de rAAV *in vitro* e *in vivo*

A terapia gênica é uma abordagem terapêutica que utiliza a transferência de ácidos nucleicos para corrigir de forma transitória ou permanente uma doença. Tem se tornado uma estratégia terapêutica alternativa potencial às abordagens farmacológicas usuais atualmente empregadas no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Utilizamos neste trabalho a terapia gênica neuroprotetora e regenerativa em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneração no SNC, com foco na neurodegeneração glaucomatosa, onde promovemos a superexpressão do miR-17 utilizando vetor de rAAV.

Foi observada elevada eficiência de transdução dos neurônios corticais primários *in vitro*, com aproximadamente 90% das células transduzidas, bem como eficiente transdução *in vivo* das CGRs. Os vetores de rAAV tem sido preferencialmente escolhidos para terapia gênica no SNC, sendo um método de entrega de ácidos nucleicos usado em ensaios clínicos em diferentes fases para distúrbios neurológicos da retina (Maguire *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2009; Constable *et al.*, 2016; Bennett *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2017). Tal escolha se deve a diversos fatores já mencionados anteriormente, dentre os quais se destacam a eficiência de transdução, a expressão do transgene estável e sustentada a longo prazo e a baixa imunogenicidade do vetor.

Foi empregado especificamente neste trabalho o vetor de rAAV1/2mut, um sorotipo híbrido capaz transduzir eficientemente neurônios da retina e cérebro. Este vetor apresenta um capsídeo híbrido contendo proteínas do tipo 1 e do tipo 2, essa com mutações pontuais em resíduos de tirosina que resultam em um aumento da sua eficiência de transdução. Resíduos de tirosina são altamente conservados em sorotipos AAV1-10 e estes resíduos expostos na superfície do capsídeo normalmente sofrem fosforilações pela cinase EGFR-PTK (Zhong *et al.*, 2008). Tais fosforilações funcionam como marcação para posterior degradação do vetor, uma vez que as proteínas fosforiladas são ubiquitinadas e o vetor é direcionado ao proteossoma para degradação. Assim sendo, tais processos resultam em uma diminuição do tráfego do vetor para o núcleo acarretando menor eficiência de transdução.

Foi verificado em células HeLa *in vitro* e hepatócitos murinos *in vivo* que a substituição de resíduos de tirosina expostas na superfície do capsídeo de AAV2 por resíduos de fenilalanina evita a fosforilação de tais resíduos e deste modo os vetores escapam da degradação mediada pela via ubiquitina-proteossoma resultando em aumento do seu transporte para o núcleo e consequentemente aumento da eficiência de transdução (Zhong *et al.*, 2008). Elevada eficiência de transdução por vetores de AAV em CGRs foi também observada em outros trabalhos (Harvey *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003). Mead *et al.*, (2020) verificaram que o AAV2 foi capaz de transduzir mais de 80% das CGRs *in vivo* após entrega no vítreo. Portanto, o vetor de rAAV é um promissor carreador de ácidos nucleicos terapêuticos no SNC, em especial na retina.

5.2 miR-17 e regeneração no SNC

Em geral, os neurônios do sistema nervoso central de mamíferos adultos são incapazes de regenerar seus axônios mediante lesões ou doenças neurodegenerativas, como no glaucoma, doença de Parkinson ou doença de Alzheimer. Como consequência, pode ocorrer a perda de populações inteiras de neurônios com déficits funcionais permanentes (Hilton & Bradke, 2017). A falha regenerativa decorre de dois motivos principais: o microambiente não permissivo ao crescimento axonal do SNC adulto no local da lesão e a perda da capacidade intrínseca de crescimento dos neurônios ao longo do desenvolvimento (Giger *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2018).

Diversos estudos tem buscado promover a regeneração axonal dos neurônios do SNC por estratégias de bloqueio das moléculas inibidoras do ambiente tecidual. No entanto, tal estratégia tem resultado em regeneração axonal limitada e incompleta (Sandvig *et al.*, 2004; Canty *et al.*, 2013; Silver *et al.*, 2014). Diante disso, muitos pesquisadores têm se concentrado em estimular a capacidade intrínseca do crescimento axonal do neurônio pela identificação e ativação de genes pró-regenerativos e vias moleculares promotoras do crescimento (Park *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011).

Neste trabalho, buscamos aprofundar o conhecimento sobre a capacidade intrínseca de crescimento axonal, onde investigamos pela primeira vez o papel individual do miR-17 na regeneração de neurônios corticais primários *in vitro*. Nossos resultados mostraram uma forte resposta regenerativa de neuritos *in vitro* 24 horas após lesão do tipo “scratch” pela superexpressão do miR-17, onde identificamos um maior crescimento de neuritos nas distâncias entre 100 μm e 200 μm da lesão em comparação ao controle. Identificamos ainda, que o miR-17 não foi capaz de aumentar o número de neuritos que cruzam a linha de 200 μm da lesão. Esses resultados sugerem que o miR-17 induz um aumento na regeneração de neuritos *in vitro* e que esse efeito é mais evidente em neuritos que crescem para os lados. Uma explicação para esse efeito é que o miR-17 pode estar influenciando também o brotamento axonal, no entanto, uma análise mais detalhada é necessária para responder completamente essa questão.

5.3 Efeito neuroprotetor do miR-17 nas CGR *in vivo*

A degeneração axonal e morte das CGR são as principais consequências do dano que o NO sofre no glaucoma (Maes *et al.*, 2017). Apesar de todos os tratamentos atualmente aprovados para o glaucoma serem focados na redução da PIO, em uma parcela significativa de pacientes a doença continua a progredir mesmo com o tratamento (De Moraes *et al.*, 2017). Alguns estudos mostraram as diferentes susceptibilidades dos pacientes glaucomatosos aos

tratamentos convencionais de redução da PIO, onde a taxa de pacientes que perderam a visão apesar do tratamento foi entre 20% a 27% para um olho e 9% para ambos os olhos (Hattenhauer *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 2002), enfatizando assim, a necessidade por novas abordagens terapêuticas para a doença.

Diante disso, torna-se fundamental, além da redução da PIO, a proteção direta das CGRs e seus axônios para controlar a neurodegeneração glaucomatosa e assim preservar a visão. Ademais, manter as CGRs vivas é um pré-requisito para promover a regeneração axonal e pode representar uma estratégia mais eficiente para o tratamento do glaucoma. Desta forma, no presente estudo buscamos promover simultaneamente a proteção das CGRs da morte e seus axônios da degeneração, bem como a regeneração dos axônios lesados. A análise do número de CGRs marcadas pelo FluoroGold revelou um aumento significativo na sobrevivência destas células em todas as regiões quantificadas. Atribuímos este resultado a um possível efeito neuroprotetor da superexpressão do miR-17 através da ativação de vias de sinalização neuroprotetoras e/ou inibição de vias pró-degenerativas.

O papel regulador dos microRNAs têm sido cada vez mais especulado na patogênese do glaucoma (Zhang *et al.*, 2015; Romano *et al.*, 2015; Li Rui *et al.*, 2018; Drewry *et al.*, 2018; Juźwik *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Vários estudos têm mostrado o potencial efeito neuroprotetor de diversos microRNAs na sobrevivência das CGRs pela ativação de vias neuroprotetoras e/ou inibição de vias apoptóticas (Su *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2019; Mead *et al.*, 2020), podendo representar importantes alvos terapêuticos para a doença. Além disso, os microRNAs podem ser usados como possíveis biomarcadores no diagnóstico precoce do glaucoma, avaliação da progressão e prognóstico da doença (Guo *et al.*, 2017; Hindle *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019).

Estudo envolvendo modelo experimental de glaucoma em camundongos investigou o papel do miR-200a na iniciação e progressão do glaucoma (Peng *et al.*, 2019). O estudo revelou que o miR-200a é regulado negativamente no glaucoma e que sua superexpressão promoveu via regulação negativa de um dos seus alvos, o fator de crescimento FGF7 a supressão da via de sinalização de MAPK, resultando na inibição da apoptose das CGRs (Peng *et al.*, 2019), demonstrando assim, potencial efeito neuroprotetor na neurodegeneração glaucomatosa.

Injeções intravítreas de um vetor viral superexpressando miR-141-3p em um modelo de glaucoma em camundongos DBA/2j de 12 semanas promoveu aumento significativo da sobrevivência das CGRs, com a regulação negativa de genes pró-apoptóticos Bax e caspase-3 e regulação positiva de genes antiapoptóticos Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2019).

Outros microRNAs, como o miR-26a, miR-137 e miR-495 tem sido ainda implicados como reguladores da apoptose em CGRs (Kang *et al.*, 2015; Li Haiyan *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Foi demonstrado que a superexpressão do miR-26 reduziu a apoptose induzida por H₂O₂ em CGRs *in vitro* com evidências de que o mecanismo neuroprotetor observado resultou provavelmente da regulação negativa de PTEN, um alvo direto já demonstrado do miR-26a (Kang *et al.*, 2015).

Recentemente, foi demonstrado que a entrega viral por AAV-2 de uma combinação de seis diferentes microRNAs, dentre eles o miR-17 em cultura primária de CGRs, bem como injeções intravítreas promoveu uma tendência neuroprotetora *in vitro* das CGRs, a preservação da espessura da CFNR, bem como a sobrevivência e preservação funcional das CGRs após LNO por esmagamento (Mead *et al.*, 2020). No entanto, novos estudos são necessários para identificar qual(is) dos microRNAs empregados melhor contribuem para os resultados observados, uma vez que foi entregue uma combinação de pelo menos três dos seis microRNAs utilizados (miR-26a, miR-17, miR-30c-2, miR92a, miR-292 e miR-182) aos modelos experimentais.

5.4 Análise do nervo óptico

A análise do NO mostrou uma maior marcação para o neurofilamento H (SMI32) e mCherry nas partes proximal e distal à lesão. Os axônios observados na parte distal do NO podem ser axônios que não degeneraram, isto é, que foram protegidos pela expressão de miR-17. Esse achado indica um possível efeito protetor do miR-17 em axônios no nervo óptico, um resultado interessante para o tratamento do glaucoma, uma vez que a degeneração dos axônios do nervo óptico é um evento precoce na doença (Munemasa & Kitaoka, 2013). Portanto, este efeito pode ser importante para promover neuroproteção completa das CGRs, já que a sobrevivência destas células também foi aumentada pelo miR-17.

No entanto, a presença de axônios na região distal do NO também pode indicar um aumento na regeneração de axônios para essa parte do NO, em que a expressão do miR-17 pode ter contribuído para estimular a capacidade intrínseca de crescimento das CGRs. A falha das CGRs em manter-se vivas e regenerar seus axônios é a base da neurodegeneração glaucomatosa e que resulta em perda permanente da visão na doença. Portanto, uma terapia que além de aumentar a sobrevivência das CGRs promova a regeneração axonal pode ser promissora para o tratamento do glaucoma. Porém com a análise feita não é possível responder se esses axônios regeneraram de fato, análises posteriores serão necessárias para responder essa questão.

Foi feita ainda uma análise nas partes distais do NO em relação presença de astrócitos pela marcação de GFAP e também avaliamos a marcação de Iba1, um marcador de micróglia. Em ambas as análises gliais não foram observadas alterações nas atividades celulares, indicando que a expressão do miR-17 nas CGRs não afetou a presença destas células gliais no NO.

5.5 Mecanismos envolvidos com os efeitos neuroprotetor e regenerativo do miR-17

Diferentes plataformas foram usadas para realizar as análises de bioinformática. Foram identificados um total de 245 alvos preditos, sendo 105 alvos já validados e 140 alvos não validados. Dentre os genes alvos preditos totais do miR-17, foi encontrado que estes estão distribuídos em todos os cromossomos. Esses dados sugerem que o miR-17 pode ser capaz de controlar genes em todos os cromossomos, indicando uma ampla regulação gênica.

A análise funcional mostrou que os produtos dos genes alvos do miR-17 se localizam em diferentes regiões sub-celulares, estando presentes em projeções neuronais, como nos axônios e dendritos e também associados a outras proteínas em complexos de fatores transcricionais. Este resultado pode sugerir pela localização subcelular que estes produtos dos genes alvos do miR-17 podem atuar regulando, por exemplo, os processos de crescimento

axonal local ou ainda regular a expressão de genes que podem estar relacionados com a degeneração e regeneração axonal.

A análise funcional dos genes alvos do miR-17 revelou ainda a participação de diversos genes alvos do miR-17 em processos biológicos e funções moleculares relacionados com a regulação da expressão gênica, como por exemplo regulação positiva da transcrição e genes codificantes de proteínas ligadoras de ácidos nucleicos e fatores de transcrição; assim como proteínas cinases, cuja atividade pode também resultar na regulação da expressão gênica. Este resultado demonstra que o miR-17 parece ser capaz de regular a expressão de genes que também são reguladores da expressão gênica, o que pode ser interessante para o propósito em promover a regeneração axonal, em que é preciso uma regulação massiva da expressão gênica.

A análise funcional de ontologia gênica mostrou ainda o enriquecimento de genes alvos do miR-17 em vias de sinalização KEGG envolvidas também com processos regenerativos (via de sinalização MAPK e via de sinalização PI3K/AKT) e orientação axonal; assim como via de sinalização envolvida com processos degenerativos, como a via do TNF, uma via cuja ativação pode desencadear o processo de apoptose, principal mecanismo de morte das CGRs na degeneração glaucomatosa.

Uma busca na literatura permitiu identificar que muitos destes alvos do miR-17 possuem papéis importantes na regulação de processos como o crescimento neurítico, regeneração axonal e morte celular neuronal. Foi identificado que os genes alvos do miR-17 são muitas das vezes inibidores dos processos regenerativos e por outro lado promotores de processos degenerativos, como a morte celular neuronal e a degeneração axonal. Deste modo, uma estratégia focada em inibir a expressão de tais genes pela expressão do miR-17 parece interessante para promover a neuroproteção e a regeneração axonal.

Os efeitos observados no crescimento neurítico pela superexpressão do miR-17 poderiam ser explicados por um dos alvos validados, a proteína PTEN, que interessantemente não apareceu entre os alvos preditos com os parâmetros utilizados na nossa análise. O gene que codifica PTEN é um supressor de tumor implicado em vários tipos de câncer e regulador negativo da via PI3K/Akt/mTOR (Dhar *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017). Processos como a sobrevivência celular, síntese de proteínas axogênicas e a dinâmica do cone de crescimento são controlados por esta via (Shi *et al.*, 2011; Berry *et al.*, 2016; Walker *et al.*, 2019; Koley *et al.*, 2019).

Diferentes evidências apontam PTEN como um importante alvo do miR-17. Utilizando ensaio repórter de luciferase, foi demonstrado que o miR-17 é capaz de se ligar a

sequência 3'UTR não traduzida do RNA mensageiro de PTEN, regulando assim a sua expressão (Li & Yang., 2012; Dhar *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017). No sistema nervoso, foi relatado que a inativação ou depleção deste mesmo gene em células neuronais pode resultar na ativação de vias envolvidas com o crescimento axonal, como é o caso da via mTOR (Park *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017). De fato, a supressão de PTEN é capaz de promover regeneração axonal no NO e medula espinhal lesionados (Park *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011; Zukor *et al.*, 2013). Logo, a inibição do mRNA de PTEN pelo miR-17 poderia promover a ativação da via PI3K/Akt/mTOR corroborando para o crescimento neurítico observado.

Um dos alvos preditos do miR-17 identificado pela análise *in silico* foi a proteína mediadora da resposta da colapsina 5 (CRMP5). CRMPs são proteínas que controlam a polimerização de microtúbulos ao se ligar aos monômeros de tubulina e deste modo influencia diretamente no crescimento e orientação axonal e dendrítico durante o desenvolvimento e regeneração axonal (Nagai *et al.*, 2017; Quach *et al.*, 2020). Outro membro da família de proteínas mediadoras da resposta da colapsina é a molécula CRMP2. Alguns estudos anteriores identificaram CRMP2 como capaz de regular a polaridade neuronal (Yoshimura *et al.*, 2005), além de estimular a formação e alongamento axonal em neurônios hipocâmpais (Inagaki *et al.*, 2001). CRMP2 induz o crescimento axonal através de sua ligação à monômeros de tubulina e posteriormente à proteínas motoras cinesina, auxiliando, assim, o transporte de tubulina solúvel para os seguimentos distais dos axônios permitindo o alongamento axonal (Brot *et al.*, 2010).

Em contraste a CRMP2, a proteína CRMP5 foi identificada como sendo responsável por bloquear a polimerização de microtúbulos e o crescimento axonal através da modulação da atividade de CRMP2. Tal efeito era observado quando as duas moléculas eram superexpressas concomitantemente, onde a molécula de CRMP5 formava um complexo ternário com a proteína MAP2 e com a tubulina, competindo assim, com CRMP2 por monômeros de tubulina impedindo o crescimento axonal (Brot *et al.*, 2010). Assim sendo, a inibição do mRNA de CRMP5 pelo miR-17 parece ser uma promissora estratégia para estimular a polimerização de microtúbulos e o crescimento axonal induzida por CRMP2.

A molécula de orientação repulsiva RGMA foi outro alvo predito do miR-17 revelado pela nossa análise *in silico*. É uma proteína sabidamente conhecida pelo seu papel na formação do tubo neural (Niederkofler *et al.*, 2004) e também foi identificada com importante papel na orientação axonal (Lah & Key, 2012) e no processo de degeneração axonal (Bossers *et al.*, 2009). Alguns trabalhos tem mostrado uma regulação positiva de RGMA após lesão no

SNC, sendo expressa por neurônios e também por células da cicatriz glial reativa que se forma ao redor da lesão (Schwab *et al.*, 2005; Hata *et al.*, 2006), sugerindo uma importante participação da molécula na inibição da regeneração axonal do SNC adulto.

Foi demonstrado que RGMA inibe o crescimento neurítico em neurônios cerebelares pós-natais *in vitro* por meio da ativação da via de sinalização da RhoA-ROCK, e que a inibição *in vivo* da molécula através do anticorpo neutralizante anti-RGMA após lesão medular promove o crescimento robusto de fibras do trato corticoespinhal, bem como a recuperação funcional locomotora (Hata *et al.*, 2006). Também foi identificado o envolvimento de RGMA na inibição do crescimento neurítico em cultura de neurônios corticais primários através da modulação de CRMP2. Foi verificado que RGMA induzia o aumento da fosforilação de CRMP2 por meio da ativação das vias de sinalização ROCK e GSK-3 β , resultando em retração de neuritos, mas tal efeito foi revertido por inibidores das enzimas ROCK e GSK-3 β (Wang *et al.*, 2013).

Além de inibir a regeneração axonal foi identificado que a molécula de orientação repulsiva RGMA foi regulada positivamente em neurônios dopaminérgicos da substância nigra de pacientes com doença de Parkinson (Bossers *et al.*, 2009) fornecendo uma possível ligação entre a molécula RGMA e a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. O direcionamento de RGMA para neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo de camundongos adultos por meio do vetor de rAAV mostrou que a molécula é capaz de induzir alterações moleculares, patológicas, anatômicas e comportamentais semelhantes ao processo neurodegenerativo que ocorre na doença de Parkinson (Korecka *et al.*, 2017).

Apesar dos experimentos supramencionados denotarem a inibição da molécula RGMA como promissora para a promoção da regeneração axonal em alguns tipos neuronais, foi demonstrado em modelos *in vitro* de explantes retiniais e modelo *in vivo* de neurodegeneração após transecção do NO em roedores que a adição da molécula RGMA promoveu aumento da sobrevivência das CGRs por meio da ativação do seu receptor Neogenina (Koeberle *et al.*, 2010). Portanto, a via neogenina/RGMA parece ter efeitos distintos e precisa ser melhor estudada em diferentes modelos e tipos celulares para esclarecer seu papel nos processos de regeneração e degeneração axonal, bem como na sobrevivência celular.

Estudo anterior mostrou que a superexpressão do fator de transcrição KLF16, um dos inúmeros membros da família dos fatores de transcrição KLFs que regulam o crescimento axonal e também alvo predito do miR-17 era capaz de inibir o crescimento de neuritos em cultura de CGRs (Wang *et al.*, 2016). O controle do crescimento neurítico pelo KLF16 parece se relacionar com o controle da expressão do receptor de Efrina 5 (EphA5) nas CGRs, onde,

uma vez ativado por seu ligante EFNA5 ocorre redução da adesão celular e colapso do cone de crescimento (Drescher *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2016).

Assim como KLF16, outro fator de transcrição implicado na inibição do crescimento e/ou regeneração axonal é o fator KLF9. Galvao *et al.*, (2018) investigando genes a jusante regulados por membros da família de fatores de transcrição KLFs identificaram que KLF9 regula a expressão da proteína DUSP14, que por sua vez desfosforila membros da família MAPK. Verificaram que o efeito inibidor do crescimento neurítico *in vitro* de CGRs, bem como a inibição da regeneração axonal após esmagamento do NO e a diminuição da sobrevivência das CGRs eram mediados pela expressão de DUSP14 promovida por KLF9. Outros trabalhos mostraram ainda que a supressão de KLF9 em roedores, em conjunto com outros tratamentos, foi capaz de promover regeneração do axônio após LNO (Apara *et al.*, 2017; Trakhtenberg *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

Concluimos com a realização deste trabalho que a terapia gênica neuroprotetora e regenerativa pela superexpressão do miR-17 nos modelos de neurodegeneração foi capaz de promover regeneração significativa de neuritos *in vitro* 24 horas após lesão do tipo “scratch” e promoveu neuroproteção completa das CGRs após LNO por esmagamento, com aumento significativo da sobrevivência das CGRs acompanhada da proteção de seus axônios nas porções proximal e distal à lesão do NO. A superexpressão do miR-17 não teve efeito sobre astrócitos e micróglia, investigadas pela marcação das proteínas GFAP e Iba1, respectivamente, nas porções distais do NO. As análises de bioinformática revelaram que diversos genes alvos preditos do miR-17 exibem participação em processos biológicos e funções moleculares que podem estar relacionados ou até mesmo explicar os processos de regeneração e neuroproteção observados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALMASIEH M, LEVIN LA. Neuroprotection in Glaucoma: Animal Models and Clinical Trials. **Annual Review of Vision Science**, v. 3, n. 15, p. 91–120, 2017.
- AN, X. *et al.* miR-106b-5p and miR-17-5p suppress osteogenic differentiation by targeting Smad5 and inhibit bone formation. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 1, p. 74-82, 2016.

- APARA, A. *et al.* KLF9 and JNK3 Interact to Suppress Axon Regeneration in the Adult CNS. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 40, p. 9632–9644, 2017.
- BAINBRIDGE, J.W. *et al.* Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 21, p. 2231-9, 2008.
- BALKE, D. *et al.* AAV-Mediated Expression of Dominant-Negative ULK1 Increases Neuronal Survival and Enhances Motor Performance in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 2, p. 685-697, 2020.
- BALTIMORE, D. *et al.* MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. **Nature immunology**, v. 9, n. 8, p. 839-45, 2008.
- BASAK, I. *et al.* microRNAs as neuroregulators, biomarkers and therapeutic agents in neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 74, p. 73: 811–827, 2016.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Capítulo 9 – Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso** (Terceira edição), Porto Alegre, Artmed, 2008.
- BELIN, S. *et al.* Injury-Induced Decline of Intrinsic Regenerative Ability Revealed by Quantitative Proteomics. **Neuron**, v. 86, n. 4, p. 1000-1014, 2015.
- BENNETT, J. *et al.* Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. **Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 661-72, 2016.
- BERRY, M. *et al.* Prospects for mTOR mediated functional repair after central nervous system Trauma. **Neurobiol Disease**, v. 85, n. 1, p. 99-110, 2016.
- BOSSERS, K. *et al.* Analysis of Gene Expression in Parkinson's Disease: Possible Involvement of Neurotrophic Support and Axon Guidance in Dopaminergic Cell Death. **Brain Pathology**, v. 19, n. 1, p. 91-107, 2009.
- BROT, S. *et al.* CRMP5 Interacts with Tubulin to Inhibit Neurite Outgrowth, Thereby Modulating the Function of CRMP2. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 32, p. 10639 – 10654, 2010.

BYRNE, L.C. *et al.* Retinoschisin gene therapy in photoreceptors, Müller glia or all retinal cells in the *Rs1h*^{-/-} mouse. **Gene Therapy**, v. 21, n. 6, p. 585-92, 2014.

CAIAZZO, M. *et al.* Krüppel-like factor 7 is required for olfactory bulb dopaminergic neuron development. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 4, p. 464-73, 2011.

CALKINS, D.J. *et al.* The challenge of regenerative therapies for the optic nerve in glaucoma. **Experience Eye Research**, v. 157, n. 1, p. 28–33, 2017.

CALKINS, D.J. Critical Pathogenic Events Underlying Progression of Neurodegeneration in Glaucoma. **Program Retina Eye Research**, v. 31, n. 6, p. 702–719, 2012.

CANTLEY, L.C.; NEEL, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences EUA**, v. 96, n. 8, p. 4240-5, 1999.

CANTY, A.J. *et al.* In-vivo single neuron axotomy triggers axon regeneration to restore synaptic density in specific cortical circuits. **National Community**, v. 2038, n. 4, p. 1-10, 2013.

CHAKRABARTI, M.; BANIK, N.L.; RAY, S.K. miR-7-1 Potentiated estrogen receptor agonists for functional neuroprotection in VSC4.1 motoneurons. **Neuroscience**, v. 256, n. 1, p. 322–333, 2014.

CHAN, L.; MAHAJAN, V.B.; TSANG, S.H. Genome Surgery and Gene Therapy in Retinal Disorders. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 4, p. 523-532, 2017.

CHANDRAN, V. *et al.* A Systems-Level Analysis of the Peripheral Nerve Intrinsic Axonal Growth Program. **Neuron**, v. 89, n. 5, p. 956-70, 2016.

CHANG, E.E.; GOLDBERG, J.L. Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. **Ophthalmology**, v. 119, n. 1, p. 979–986, 2012.

CHEN, H. *et al.* Expression patterns and role of PTEN in rat peripheral nerve development and injury. **Neuroscience Letter**, v. 676, n. 1, p. 78-84, 2018.

CHRISTIE, K.J. *et al.* PTEN Inhibition to Facilitate Intrinsic Regenerative. Outgrowth of Adult Peripheral Axons. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 27, p. 9306 –9315, 2010.

CLOONAN, N. *et al.* The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. **Genome Biology**, v. 9, n. 8, p. 1–14, 2008.

CONFORTI, L.; GILLEY, J.; COLEMAN, M.P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 394–409, 2014.

CONSTABLE, I.J. *et al.* Phase 2a Randomized Clinical Trial: Safety and Post Hoc Analysis of Subretinal rAAV.sFLT-1 for Wet Age-related Macular Degeneration. **EBioMedicine**, v. 14, n. 1, p. 168–175, 2016.

CRAIR, M.C.; MASON, C.A. Reconnecting Eye to Brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 42, p. 10707–10722, 2016.

CRISH, S.D.; CALKINS, D.J. Neurodegeneration in Glaucoma: Progression and Calcium-Dependent Intracellular Mechanisms. **Neuroscience**, v. 176, n. 1, p. 1–11, 2011.

DALIRI, K.; LJUBIMOV, A.V.; HEKMATIMOGHADDAM, S. Glaucoma, Stem Cells, and Gene Therapy: Where Are We Now? **International Journal of Stem Cells**, v. 10, n. 2, p. 119–128, 2017.

DE MORAES, C.G.; LIEBMANN, J.M.; LEVIN, L.A. Detection and measurement of clinically meaningful visual field progression in clinical trials for glaucoma. **Program Retina Eye Research**, v. 56, n. 1, p. 107–147, 2017.

DELLAGO, H.; BOBBILI, M.R.; GRILLARI, J. MicroRNA-17-5p: At the Crossroads of Cancer and Aging – A Mini-Review. **Gerontology**, v. 63, n. 1, p. 20–28, 2016.

DENG, S. *et al.* Autophagy in Retinal Ganglion Cells in a Rhesus Monkey Chronic Hypertensive Glaucoma Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

DERAKHSHAN, A.; CHEN, Z.; WAES, C.V. Therapeutic small-molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. **Clinic Cancer Research**, v. 23, n. 6, p. 1379–1387, 2017.

DHAR, S. *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. 27214–26, 2015.

DIETZE, J.; BLAIR, K.; HAVENS, S.J. **Glaucoma**. StatPearls, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30855805/>. Acesso em: 21 set. 2020

DRESCHER, U. *et al.* In Vitro Guidance of Retinal Ganglion Cell Axons by RAGS, a 25 kDa Tectal Protein Related to Ligands for Eph Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 82, n. 3, p. 359-70, 1995.

DREWRY, M.D. *et al.* Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 7, p. 1263-1275, 2018.

ELSAEIDI, F. *et al.* Jak/Stat signaling stimulates zebrafish optic nerve regeneration and overcomes the inhibitory actions of Socs3 and Sfpq. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2632–2644, 2014.

ESPORCATTE, B.L.B.; TAVARES, I.M. Normal-tension glaucoma: an update. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, n. 4, p. 270-276, 2016.

EVANGELHO, K. *et al.* Pathophysiology of primary open-angle glaucoma from a neuroinflammatory and neurotoxicity perspective: a review of the literature. **International Ophthalmology**, v. 39, n. 1, p. 259-271, 2019.

FAGOE, N.D. *et al.* Over-expression of ATF3 or the combination of ATF3, c-Jun, STAT3 and Smad1 promotes regeneration of the central axon branch of sensory neurons but without synergistic effects. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 23, p. 6788-800, 2015.

FEINER, L.; PILTZ-SEYMOUR, J.R. Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study: a summary of results to date. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 14, n. 2, p. 106-11, 2003.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L. *et al.* Astrocytes and Müller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic at Modelo Retinitis Pigmentosa. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2015.

FILHO, J.C.M.R.; KIMURA, E.T. MicroRNAs: Nova classe de reguladores genéticos envolvidos na função endócrina e no câncer. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102-7, 2006.

- FLUSBERG, D.A.; SORGER, P.K. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. **Trends Cell Biology**, v. 25, n. 8, p. 446–458, 2015.
- FRICKER, M. *et al.* Neuronal Cell Death. **Physiological Reviews**. v. 98, n. 1, p. 813–880, 2018.
- GALVAO, J. *et al.* The Kruppel-Like Factor Gene Target Dusp14 Regulates Axon Growth and Regeneration. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 59, n. 7, p. 2736-2747, 2018.
- GAUDET, A.D. *et al.* MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. **Neuroscientist**, v. 24, n. 3, p. 221-245, 2018.
- GAUTHIER, A.C.; LIU, J. Neurodegeneration and Neuroprotection in Glaucoma. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 89, n. 1, p. 73-79, 2016.
- GIGER, R.J.; HOLLIS, E.R.; TUSZYNSKI, M.H. Guidance Molecules in Axon Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 2, n. 7, p. 1-21, 2010.
- GROSSNIKLAUS, H.E.; GEISERT, E.E.; NICKERSON, J.M. Introduction to the Retina. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 134, n. 1, p. 383-396, 2015.
- GUO, F. *et al.* Chemoresistance and targeting of growth factors/cytokines signalling pathways: towards the development of effective therapeutic strategy for endometrial cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 8, n. 7, p. 1317-1331, 2018.
- GUO, R. *et al.* Relationship between the Pathogenesis of Glaucoma and miRNA. **Ophthalmic Research**, v. 57, n. 3, p. 194-199, 2017.
- GUPTA, D.; CHEN, P.P. Glaucoma. **American Family Physician**, v. 93, n. 8, p. 668-674, 2016.
- HARVEY, A.R. *et al.* Intravitreal Injection of Adeno-associated Viral Vectors Results in the Transduction of Different Types of Retinal Neurons in Neonatal and Adult Rats: A Comparison with Lentiviral Vectors. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 21, n. 1, p. 141-157, 2002.
- HATA, K. *et al.* RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. **The Journal of Cell Biology**, v. 173, n. 1, p. 47-58, 2006.

HATTENHAUER, M.G. *et al.* The probability of blindness from open-angle glaucoma. **Ophthalmology**, v. 105, n. 1, p. 2099–2104, 1998.

HAUSWIRTH, W.W. *et al.* Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 10, p. 979-990, 2008.

HE, Z.; JIN, Y. Intrinsic Control of Axon Regeneration. **Neuron**, v. 90, n. 3, p. 437-451, 2016.

HEINRICH, P.C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemistry Journal**, v. 374, n. 1, p. 1-20, 2003.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770–6. [PubMed: 11048727] APUD: DERAKHSHAN, A.; CHEN, Z.; WAES, C.V. Therapeutic small-molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. **Clinic Cancer Research**, v. 23, n. 6, p. 1379–1387, 2017.

HILL, C.E. A view from the ending: axonal dieback and regeneration following SCI. **Neuroscience Letters**, v. 652, n. 1, p. 11-24, 2017.

HILTON, B.J.; BRADKE, F. Can injured adult CNS axons regenerate by recapitulating development? **The Company of Biologists**, v. 144, n. 19, p. 3417-3429, 2017.

HINDLE, A.G. *et al.* Identification of Candidate miRNA Biomarkers for Glaucoma. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 60, n. 1, p. 134-146, 2019.

HIROSE, T.; MISHIMA, Y.; TOMAR, Y. Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. **EMBO Reports**, v. 15, n. 5, p. 489–507, 2014.

HIRT, J. *et al.* Contribution of autophagy to ocular hypertension and neurodegeneration in the DBA/2J spontaneous glaucoma mouse model. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2018.

HOMBACH, S.; KRETZ, M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. **Advances Experimental Medicine and Biology**, v. 937, n. 1, p. 3-17, 2016.

HONG, P.; JIANG, M.; LI, H. Functional requirement of dicer1 and miR-17-5p in reactive astrocyte proliferation after spinal cord injury in the mouse. **Wiley Periodicals**, v. 62, n. 12, p. 2044-2060, 2014.

HOSSAIN, M.M. *et al.* Hyperactivation of nuclear receptor coactivators induces PERK-dependent cell death. **Oncotarget**, v. 9, n. 14, p. 11707-11721, 2018.

HU, H.; LI, H.; HE, Y. MicroRNA 17 downregulates expression of the PTEN gene to promote the occurrence and development of adenomyosis. **Experimental and Therapeutic medicine**, v. 14, n. 1, p. 3805-3811, 2017.

HU, Y.B. *et al.* miR-425 deficiency promotes necroptosis and dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 8, p. 1-15, 2019.

HUANG, X. *et al.* Bypassing drug resistance by triggering necroptosis: recent advances in mechanisms and its therapeutic exploitation in leukemia. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1-15, 2018.

HUANG, Z.R. *et al.* Tyrosine-mutated AAV2 mediated shRNA silencing of PTEN promotes axon regeneration of adult optic nerve. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. 1-19, 2017.

HUEBNER, E.A.; STRITTMATTER, S.M. Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 48, n. 1, p. 339-351, 2009.

HUTCHISON, E.R.; OKUN, E.; MATTSON, M.P. The Therapeutic Potential of microRNAs in Nervous System Damage, Degeneration and Repair. **Neuromolecular Medicine**, v. 11, n. 3, p. 153-161, 2009.

HYMAN, L.G. *et al.* Treatment and Vision-Related Quality of Life in the Early Manifest Glaucoma Trial. **Ophthalmologia**, v. 112, n. 9, p. 1505-1513, 2005.

INAGAKI, N. *et al.* CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 781-782, 2001.

IYER, A.N.; BELLON, A.; BAUDET, M.L. microRNAs in axon guidance. **Frontier Cell Neuroscience**, v. 8, n. 78, p. 1-14, 2014.

- JANKOWSKI, M.P. *et al.* SRY-Box Containing Gene 11 (Sox11) Transcription Factor Is Required for Neuron Survival and Neurite Growth. **Neuroscience**, v. 143, n. 2, p. 501–514, 2006.
- JONAS, J.B. *et al.* **Glaucoma. Seminar**, v. 390, n. 1, p. 2183–93, 2017.
- JUTLEY, G. *et al.* Management of glaucoma as a neurodegenerative disease. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 7, n. 2, p. 157–172, 2017.
- JUZWIK, C.A. *et al.* microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. **Progress in Neurobiology**, v. 182, n. 1, p. 101664, 2019.
- KANDEL, E.R. *et al.* **Capítulo 26 - Neurociências** (Quinta Edição), Porto Alegre. AMGH, 2014.
- KANG, Y. *et al.* MicroRNA 26a overexpression protects RGC-5 cells against H₂O₂-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 1, p. 164–169, 2015.
- KERSCHENSTEINER, M. *et al.* In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. **Nature Medicine**, v. 11, n. 1, p. 572–577, 2005.
- KHATIB, T.Z.; MARTIN, K.R. Protecting retinal ganglion cells. **Eye**, v. 31, n. 1, p. 218–224, 2017.
- KIMURA, A. *et al.* Targeting Oxidative Stress for Treatment of Glaucoma and Optic Neuritis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n.1, p. 1–8, 2017.
- KISSELEVA, T. *et al.* Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future Challenges. **Gene**, v. 285, n. 1, p. 1–24, 2002.
- KNOFERLE, J. *et al.* Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences EUA**, v. 107, n. 13, p. 6064–6069, 2010.
- KOCH, J.C.; LINGOR, P. The role of autophagy in axonal degeneration of the optic nerve. **Experimental Eye Research**, v. 144, n.1, p. 81–89, 2016.

- KOCH, J.C. *et al.* ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. **Cell Death Disease**, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2014.
- KOEBERLE, P.D. *et al.* The repulsive guidance molecule, RGMa, promotes retinal ganglion cell survival in vitro and in vivo. **Neuroscience**, v. 169, n. 1, p. 495-504, 2010.
- KOLEY, S. *et al.* Translating regeneration: Local protein synthesis in the neuronal injury response. **Neuroscience Research**, v. 139, n.1, p. 26-36, 2019.
- KORECKA, J.Á. *et al.* Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) Induces Neuropathological and Behavioral Changes That Closely Resemble Parkinson's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 39, p. 9361–9379, 2017.
- KUSUDA, R. *et al.* Differential expression of microRNAs in mouse pain models. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 7–17, 2011.
- LAGOS-QUINTANA, M. *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Current Biology**, v. 12, n. 9, p. 735-739, 2002.
- LAH, G.J.; KEY, B. Dual Roles of the Chemorepellent Axon Guidance Molecule RGMa in Establishing Pioneering Axon Tracts and Neural Fate Decisions in Embryonic Vertebrate Forebrain. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n.11, p. 1458-1470, 2012.
- LAHA, B.; STAFFORD, B.K.; HEBERMAN, A.D. Regenerating optic pathways from the eye to the brain. **Science**, v. 356, n. 6342, p. 1031-1034, 2017.
- LAURENT, G.S.L.; WAHLESTEDT, C. Noncoding RNAs: couplers of analog and digital information in nervous system function? **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 12, p. 612-621, 2007.
- LAWLOR, M. *et al.* Glaucoma and the brain: trans-synaptic degeneration, structural change and implications for neuroprotection. **Survey of Ophthalmology**, v. 63, n. 3, p. 296-306, 2017.
- LEE, R.C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862-4, 2001.
- LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEIBINGER, M. *et al.* Neuronal STAT3 activation is essential for CNTF - and inflammatory stimulation-induced CNS axon regeneration. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 9, p. 1-8, 2013.

LENT R., **Capítulo 9 - Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociências** (Segunda Edição), Rio de Janeiro, Atheneu, 2010.

LESKE, M.C. *et al* Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma Trial. **Arch Ophthalmol**, v. 121, n. 1, p. 48-56, 2003.

LI, H.; YANG, B.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. 1653-1668, 2012.

LI, H. *et al.* MicroRNA-137 regulates hypoxia-induced retinal ganglion cell apoptosis through Notch1. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n.3, p. 1774-1782, 2018.

LI, P.; TENG, Z.Q.; LIU, C.M. Extrinsic and Intrinsic Regulation of Axon Regeneration by MicroRNAs after Spinal Cord Injury. **Neural Plasticity**, v. 2016, n.1, p. 1-11, 2016.

LI, R. *et al.* MiR-93-5p targeting PTEN regulates the NMDA-induced autophagy of retinal ganglion cells via AKT/mTOR pathway in glaucoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, n. 1, p. 1-7, 2018.

LI, S. *et al.* Let-7 microRNAs Regenerate Peripheral Nerve Regeneration by Targeting Nerve Growth Factor. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 3, p. 423-433, 2015.

LI, W-P. *et al.* Molecular mechanism of panaxydol on promoting axonal growth in PC12 cells. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 11, p. 1927-1936, 2018.

LIM, L.P. *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769-773, 2005.

LIN, L. *et al.* Sox11 Regulates Survival and Axonal Growth of Embryonic Sensory Neurons. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 1, p. 52-64, 2011.

LINDEN, R.; MATTE, U. A snapshot of gene therapy in Latin America. **Genetics Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 294-298, 2014.

LINGOR, P. *et al.* Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 1, p. 289-311, 2012.

- LIU, K. *et al.* Neuronal Intrinsic Mechanisms of Axon Regeneration. *Annu. Rev. Neuroscience*, v. 34, n. 1, p. 131–152, 2011.
- LIU, N.K. *et al.* Altered MicroRNA Expression following Traumatic Spinal Cord Injury. *Experimental Neurology*, v. 219, n. 2, p. 424–429, 2009.
- LIU, N.K.; XU, X.M. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders. *Physiological Genomics*, v. 43, n. 10, p. 571-580, 2011.
- LIU, X. *et al.* Gene Therapy Targeting Glaucoma: Where Are We? *Survey of Ophthalmology*, v. 54, n. 4, p. 472–486, 2009.
- LIU, X.; WILLIAMS, P.R.; HE, Z. SOCS3: A common target for neuronal protection and axon regeneration after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, v. 263, n. 1, p. 364–367, 2015.
- LIU, Y. *et al.* Discovery and Validation of Circulating Hsa-miR-210-3p as a Potential Biomarker for Primary Open-Angle Glaucoma. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, v. 60, n. 8, p. 2925-2934, 2019.
- LU, X. *et al.* MiR-133b Promotes Neurite Outgrowth by Targeting RhoA Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 246-258, 2015.
- LUAN, Y.; CHEN, M.; ZHOU, L. MiR-17 targets PTEN and facilitates glial scar formation after spinal cord injuries via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Brain Research Bulletin*, v. 128, n. 1, p. 68-75, 2016.
- LUO, J.M. *et al.* PI3K/akt, JAK/STAT and MEK/ERK pathway inhibition protects retinal ganglion cells via different mechanisms after optic nerve injury. *European Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 4, p. 828-842, 2007.
- LUO, X. *et al.* Three-dimensional evaluation of retinal ganglion cell axon regeneration and pathfinding in whole mouse tissue after injury. *Experimental Neurology*. v. 247, n. 1, p. 653–662, 2013.
- LYIRHIARO, G.O. *et al.* Regulation of ischemic neuronal death by E2F4-p130 protein complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 289, n. 26, p. 18202-13, 2014.

MACHADO, A.; HAERTEL, L.M., **Capítulo 29 - Neuroanatomia funcional** (Terceira Edição), São Paulo, Atheneu, 2014.

MADDINENI, P. *et al.* CNS axonal degeneration and transport deficits at the optic nerve head precede structural and functional loss of retinal ganglion cells in a mouse model of glaucoma. **Molecular Neurodegeneration**, v. 15, n. 1, p. 1-20, 2020.

MADHUNAPANTULA, S.V.; ROBERTSON, G.P. Is B-Raf a Good Therapeutic Target for Melanoma and Other Malignancies? **Cancer Research**, v. 68, n. 1, p. 5-8, 2008.

MAES, M.E.; SCHLAMP, C.L.; NICKELLS, R.W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. **Program Retina Eye Research**, v. 57, n. 1., p. 1-25, 2017.

MAGUIRE, A.M. *et al.* Agedependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet**, v. 374, n. 1, p. 1597–1605, 2009.

MAGUIRE, A.M. *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 21, p. 2240-2248, 2008.

MAHAR, M.; CAVALLI, V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 323–337, 2018.

MAO, S. *et al.* miR-17 regulates the proliferation and differentiation of the neural precursor cells during mouse corticogenesis. **FEBS Journal**, v. 281, n. 4, p. 1144-1158, 2014.

MARTIN, K.R.G. *et al.* Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 10, p. 4357-4365, 2003.

MARTINEZ, B.; PELOW, P.V. MicroRNAs as disease progression biomarkers and therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 10, p. 1831-1837, 2020.

MASOUD, A.M. *et al.* Altered microRNA, mRNA, and Protein Expression of Neurodegeneration-Related Biomarkers and Their Transcriptional and Epigenetic Modifiers in a Human Tau Transgenic Mouse Model in Response to Developmental Lead Exposure. **Journal Alzheimers Disease**, v. 63, n.1, p. 273–282, 2018.

- MEAD, B. *et al.* Viral delivery of multiple miRNA promotes retinal ganglion cell survival and functional preservation after optic nerve crush injury. **Experimental Eye Research**, v. 197, n. 1, p. 1–27, 2020.
- MENDELL, J.R. *et al.* Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 18, p. 1713-1722, 2017.
- MENDOZA, M.C.; ER, E.E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. **Trends Biochemistry Science**, v. 36, n. 6, p. 320–328, 2011.
- MEUR, G.L. *et al.* Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with *RPE65* Leber Congenital Amaurosis. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 1, p. 256–268, 2018.
- MIAO, T. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 37, p. 9512–9519, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, **Panorama – Glaucoma**. 2014. Disponível em: [file:///C:/Users/55319/Downloads/2.%20g\)%20Glaucoma.pdf](file:///C:/Users/55319/Downloads/2.%20g)%20Glaucoma.pdf). Acesso em: 8 abr. 2020.
- MOISEYEV, G. *et al.* RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, n. 35, p. 12413-8, 2005.
- MOLDAY, R.S.; MORITZ, O.L. Moritz. Photoreceptors at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 22, p. 4039-4045, 2015.
- MOORE, D.L. *et al.* KLF Family Members Regulate Intrinsic Axon Regeneration Ability. **Science**, v. 326, n. 5950, p. 298–301, 2009.
- MUNEMASA, Y.; KITAOKA, Y. Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, n. 60, p. 1-13, 2013.
- MURRAY, A.J. Axon Regeneration: What Needs to Be Overcome? **Methods Molecular Biology**, v. 1162, n. 1, p. 3-14, 2014.

- NAGAI, J.; BABA, R.; OHSHIMA, T. CRMPs Function in Neurons and Glial Cells: Potential Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases and CNS Injury. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 4243-4256, 2017.
- NIEDERKOFER, V. *et al.* Repulsive Guidance Molecule (RGM) Gene Function Is Required for Neural Tube Closure But Not Retinal Topography in the Mouse Visual System. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 808–818, 2004.
- NORSWORTHY, M. *et al.* Sox11 Expression Promotes Regeneration of Some Retinal Ganglion Cell Types but Kills Others. **Neuron**, v. 94, n. 6, p. 1112–1120, 2017.
- OLIVER, J.E. *et al.* Blindness and glaucoma: a comparison of patients progressing to blindness from glaucoma with patients maintaining vision. **American Journal Ophthalmology**, v. 133, n. 1, p. 764–772, 2002.
- OSBORNE, A. *et al.* Neuroprotection of retinal ganglion cells by a novel gene therapy construct that achieves sustained enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor-B signaling. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2018.
- O'BRIEN, J. *et al.* Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers Endocrinology**, v. 9, n. 402, p. 1-12, 2018.
- PARENTE, V.; CORTI, S. Advances in spinal muscular atrophy therapeutics. **Therapeutic Advances Neurological Disorders**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.
- PARK, H.Y.L.; KIM, J.H.; PARK, C.K. Activation of autophagy induces retinal ganglion cell death in a chronic hypertensive glaucoma model. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 4, p. 1-9, 2012.
- 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.
- PEARSON, C.S. *et al.* Identification of a critical sulfation in chondroitin that inhibits axonal regeneration. **eLife**, v. 7, N. 1, p. 1-21, 2018.
- PELTIER, J.; O'NEILL, A.; SCHAFFER, D.V. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. **Developmental Neurobiology**, v. 67, n. 10, p. 1348-1361, 2007.

PENG, H. *et al.* Neuroprotective effects of overexpressed microRNA-200a on activation of glaucoma-related retinal glial cells and apoptosis of ganglion cells via downregulating FGF7-mediated MAPK signaling pathway. **Cellular Signalling**, v. 54, n. 1, p. 179-190, 2019.

PERNET, V. *et al.* Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 7, p. 1-11, 2013.

PESCHANSKY, V.J.; WAHLESTEDT, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. **Epigenética**, v. 9, n. 1, p. 3–12, 2014.

PETIT, L.; KHANNA, H.; PUNZO, C. Advances in Gene Therapy for Diseases of the Eye. **Human Gene Therapy**, v. 27, n. 8, p. 563-579, 2016.

PRASAD, S.; GALETTA, S.L. Anatomy and physiology of the afferent visual system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 102, n. 1, p. 3-19, 2011.

QIAN, T. *et al.* Novel miR-sc4 regulates the proliferation and migration of Schwann cells by targeting Cdk5r1. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 447, n. 1, p. 209-215, 2018.

QIN, S.; ZOU, Y.; ZHANG, C.L. Crosstalk between KLF4 and STAT3 regulates axon regeneration. **Nat Commun.** V. 4, n. 1, p. 1-19, 2013.

QUACH, T.T. *et al.* Collapsin Response Mediator Proteins: Novel targets for Alzheimer's disease. **Journal Alzheimers Disease**, v. 77, n. 3, p. 949–960, 2020.

RAFF, M.C.; WHITMORE, A.V.; FINN, J.T. Axonal Self-Destruction and Neurodegeneration. **Science**, v. 296, n. 5569, p. 868-871, 2002.

RAIVICH, G. *et al.* The AP-1 Transcription Factor c-Jun Is Required for Efficient Axonal Regeneration. **Neuron**, v. 43, n. 1, p. 57-67, 2004.

RASHID, K.; AKHTAR-SCHAEFER, I.; LANGMANN, T. Microglia in Retinal Degeneration. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2019.

RATICAN, S.E.; OSBORNE, A.; MARTIN, K.R. Progress in Gene Therapy to Prevent Retinal Ganglion Cell Loss in Glaucoma and Leber's Hereditary Optic Neuropathy. **Neural Plasticity**, v. 2018, n. 1, p. 1-11, 2018.

RAWLINGS, J.S.; ROSLER, K.M.; HARRISON, D.A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281-3, 2004.

REN, X. *et al.* MiR-17-5p inhibits cerebral hypoxia/reoxygenation injury by targeting PTEN through regulation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **International Journal Neuroscience**, v. 132, n. 2, p. 192-200, 2020.

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, n. 231, p. 1-18, 2017.

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, n.1, p. 72–86, 2017.

RIBAS, V.T.; LINGOR, P. Autophagy in degenerating axons following spinal cord injury: evidence for autophagosome biogenesis in retraction bulbs. **Neural Regeneration**, v. 10, n. 1, p. 198-200, 2015.

RIBAS, V.T. *et al.* Early and Sustained Activation of Autophagy in Degenerating Axons after Spinal Cord Injury. **Brain Pathology**, v. 25, n. 2, p. 157-170, 2015.

ROMANO, G.L. *et al.* MicroRNA target prediction in glaucoma. **Progress in Brain Research**, v. 220, n. 1, p. 217-240, 2015.

RUSSELL, S. *et al.* Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. **Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 849–860, 2017.

SABA, R.; SORENSEN, D.L.; BOOTH, S.A. MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 578, p. 1–11, 2014.

SALTA, E.; DE STROOPER, B. Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. **The Lancet Neurology**, v. 11, n.2, p. 189–200, 2012.

SANDVIG, A. *et al.* Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. **Glia**, v. 46, n. 3, p. 225-251, 2004.

SARAIVA, C.; ESTEVES, M.; BERNARDINO, L. MicroRNA: basic concepts and implications for regeneration and repair of neurodegenerative diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 118-131, 2017.

SARAIVA, J.; NOBRE, R.J.; ALMEIDA, L.P. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. **Journal of Controlled Release**, v. 241, n.1, p. 94-109, 2016.

SCHLEICH, K.; LAVRIK, I.N. Mathematical modeling of apoptosis. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n.1, p. 44, 2013.

SCHWAB, J.M. *et al.* Central Nervous System Injury–Induced Repulsive Guidance Molecule Expression in the Adult Human Brain. **Archives of Neurology**. v. 62, n. 10, p. 1561-1568, 2005.

SEIFFERS, R.; MILLS, C.D.; WOOLF, C.J. ATF3 Increases the Intrinsic Growth State of DRG Neurons to Enhance Peripheral Nerve Regeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 30, p. 7911–7920, 2007.

SEILLIER, M. *et al.* TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 9, p. 1525-1535, 2012.

SENGILLO, J.D. *et al.* Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: na update. **American Journal of medical genetics**, 2016; 172: 349-366.

SHI, X. *et al.* Glucagon-like peptide-2-stimulated protein synthesis through the PI 3-kinase-dependent Akt-mTOR signaling pathway. **American Journal of Physiology Endocrinol and Metabolism**, 2011; 300 (3): E554–E563.

SILVER, J.; SCHWAB, M.E.; POPOVICH, P.G. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 7, n. 3, p. 1-22, 2014.

SMITH, P.D. *et al.* SOCS3 Deletion Promotes Optic Nerve Regeneration In Vivo. **Neuron**, v. 64, n. 5, p. 617-623, 2009.

SU, W.; ALOI, M.S.; GARDEN, G.A. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. **Brain, Behavior, and Immunity**. V. 52, n. 1, p. 1-8, 2016.

SU, W. *et al.* microRNA-21a 5p/PDCD4 axis regulates mesenchymal stem cell-induced neuroprotection in acute glaucoma. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 289-301, 2017.

SUN, F.; HE, Z. Neuronal intrinsic barriers for axon regeneration in the adult CNS. **Current Opinion Neurobiology**. v. 20, n. 4, p. 510–518, 2010.

SUN, F. *et al.* Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. **Nature**, v. 480, n. 7377, p. 372-375, 2011.

SUN, N. *et al.* miR-17 regulates the proliferation and differentiation of retinal progenitor cells by targeting CHMP1A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 523, n. 2, p. 493-499, 2020.

YOSHIMURA, T. *et al.* GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 137-149, 2005.

TATARD, V.M. *et al.* ZNF238 is expressed in postmitotic brain cells and inhibits brain tumor growth. **Cancer Research**. v. 70, n.3, p. 1236-1246, 2010.

THOMAS, C.N. *et al.* Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

TRAKHTENBERG, E.F. *et al.* Zinc chelation and Klf9 knockdown cooperatively promote axon regeneration after optic nerve injury. **Experimental Neurology**. v. 300, n.1, p. 22–29, 2018.

VAHSEN, B.F. *et al.* Inhibition of the autophagic protein ULK1 attenuates axonal degeneration in vitro and in vivo, enhances translation, and modulates splicing. **Cell Death & Differentiation**, v. 27, n. 10, p. 2810-2827, 2020.

VECINO, E. *et al.* Glia-neuron interactions in the mammalian retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 51, n. 1, p. 1-40, 2016.

VELDE, S.V.D. *et al.* Towards axonal regeneration and neuroprotection in glaucoma: Rho kinase inhibitors as promising therapeutics. **Progress in Neurobiology**, v. 131, n. 1, p. 105–119, 2015.

VELDMAN, M.B. *et al.* Gene expression analysis of zebrafish retinal ganglion cells during optic nerve regeneration identifies KLF6a and KLF7a as important regulators of axon regeneration. **Developmental Biology**, v. 312, n. 2, p. 596-612, 2007.

VENKATESHA, I.; BLACKMORE, M.G. Selecting Optimal Combinations of Transcription Factors to Promote Axon Regeneration: Why Mechanisms Matter. **Neuroscience Letters**, v. 652, n. 1, p. 64–73, 2017.

WALKER, C.L. *et al.* Bisperoxovanadium Mediates Neuronal Protection through Inhibition of PTEN and Activation of PI3K/AKT-mTOR Signaling after Traumatic Spinal Injuries. **Journal of Neurotrauma**, v. 36, n. 18, p. 2676–2687, 2019.

WAN, X. *et al.* Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber’s Hereditary Optic Neuropathy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21587, 2016.

WANG, H. *et al.* miR-219 Cooperates with miR-338 in Myelination and Promotes Myelin Repair in the CNS. **Developmental Cell**. v. 40, n. 6, p. 566–582, 2017.

WANG, J. *et al.* Novel Roles and Mechanism for Krüppel-like Factor 16 (KLF16) Regulation of Neurite Outgrowth and Ephrin Receptor A5 (EphA5) Expression in Retinal Ganglion Cells. **Journal Biological Chemistry**, v. 291, n. 35, p. 18084-18095, 2016.

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

WANG, Q. *et al.* Paraquat and MPTP alter microRNA expression profiles, and downregulated expression of miR-17-5p contributes to PQ-induced dopaminergic neurodegeneration. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 5, p. 665-677, 2018.

WANG, T. *et al.* CRMP-2 Is Involved in Axon Growth Inhibition Induced by RGMa In Vitro and In Vivo. **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 3, p. 903-913, 2013.

WANG, Y.U.; SONG, M.; SONG, F. Neuronal autophagy and axon degeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 13, p. 2389-2406, 2018.

WANG, Z. *et al.* KLF6 and STAT3 co-occupy regulatory DNA and functionally synergize to promote axon growth in CNS neurons. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

WANG, Z. *et al.* Overexpression of sox11 promotes corticospinal tract regeneration after spinal injury while interfering with functional recovery. **Journal Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 3139-3145, 2015.

WEINREB, R.N. *et al.* Primary open-angle glaucoma. **Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2016.

WILUSZ, J.E.; SUNWOO, H.; SPECTOR, D.L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. **Genes & development**, v. 23, n. 13, p. 1494–1504, 2009.

WU, Y.Y.; BRADSHAW, R. Synergistic Induction of Neurite Outgrowth by Nerve Growth Factor or Epidermal Growth Factor and Interleukin-6 in PC12 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 22, p. 13033–13039. 1996.

YAN, H. *et al.* MicroRNAs as potential therapeutics for treating spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 1, p. 1352–1359, 2012.

YANG, J. *et al.* Pathological axonal death through a MAPK cascade that triggers a local energy deficit. **Cell**, v. 160, n. 1, p. 161-76, 2015.

YANG, Y. *et al.* Autophagy in axonal and dendritic degeneration. **Trends Neuroscience**, v. 36, n. 7, p. 418–428, 2013.

YAP, T.E. *et al.* Annexins in Glaucoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–18, 2018.

YARON, A.; SCHULDINER, O. Common and Divergent Mechanisms in Developmental Neuronal Remodeling and Dying Back Neurodegeneration. **Current Biology**, v. 26, n. 13, p. R628–R639, 2016.

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

ZHANG, J.N. *et al.* Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

ZHANG, L.Q. *et al.* MicroRNA-141-3p inhibits retinal neovascularization and retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma mice through the inactivation of Docking protein 5-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Journal of Cell Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8873-8887, 2019.

ZHANG, Q. *et al.* miR-708 and miR-335-3p Inhibit the Apoptosis of Retinal Ganglion Cells Through Suppressing Autophagy. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 2, p. 284-292, 2020.

ZHANG, Q. *et al.* Decreased miR-187 induces retinal ganglion cell apoptosis through upregulating SMAD7 in glaucoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, n. 1, p. 19-25, 2015.

ZHANG, X.; YANG, Y.; FENG, Z. Suppression of microRNA-495 alleviates high-glucose-induced retinal ganglion cell apoptosis by regulating Notch/PTEN/Akt signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, n. 1, p. 923-929, 2018.

ZHENG, M. *et al.* Netrin-1 Promotes Synaptic Formation and Axonal Regeneration via JNK1/c-Jun Pathway after the Middle Cerebral Artery Occlusion. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. 13, p. 1-14, 2018.

ZHONG, L. *et al.* Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: Point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 105, n. 22, p. 7827-7832, 2008.

ZHOU, M. *et al.* MiR-17-92 cluster is a novel regulatory gene of cardiac ischemic/reperfusion injury. **Medical Hypotheses**, v. 81, n. 1, p. 108-110, 2013.

ZHOU, S.; DING, F.; GU, X. Non-coding RNAs as Emerging Regulators of Neural Injury Responses and Regeneration. **Neuroscience**, v. 32, n. 3, p. 253–264, 2016.

ZUKOR, K. *et al.* Short hairpin RNA against PTEN enhances regenerative growth of corticospinal tract axons after spinal cord injury. **Journal Neuroscience**, v. 33, n. 1, p. 15350 – 15361, 2013.