

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

Carolina Gomes Ferreira

**ANÁLISE DO PAPEL DO MIR-22 NA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE
NEURÔNIOS EM MODELOS IN VITRO**

Belo Horizonte
2025

Carolina Gomes Ferreira

**ANÁLISE DO PAPEL DO MIR-22 NA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE
NEURÔNIOS EM MODELOS IN VITRO**

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: Prof. Dr. Vinicius de Todelo Ribas

Belo Horizonte
2025

043

Ferreira, Carolina Gomes.

Análise do papel do miR-22 na degeneração e regeneração de neurônios em modelos in vitro [manuscrito] / Carolina Gomes Ferreira. – 2025.

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

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Todelo Ribas.

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

1. Biologia Celular. 2. MicroRNAs. 3. Regulação da Expressão Gênica. 4. Degeneração Neural. 5. Dependovirus. I. Ribas, Vinicius de Todelo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
CAROLINA GOMES FERREIRA**

Às **quatorze horas** do dia **25 de fevereiro de 2025**, 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: "**ANÁLISE DO PAPEL DO MIR-22 NA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE NEURÔNIOS EM MODELOS IN VITRO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Vinicius de Toledo Ribas**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Vinicius de Toledo Ribas	UFMG	aprovada
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	aprovada
Dra. Luciene Bruno Vieira	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, 25 de fevereiro de 2025.**

Dr. Vinicius de Toledo Ribas (Orientador) _____

Dr^a. Erika Cristina Jorge _____

Dr^a. Luciene Bruno Vieira _____

Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professor(a)**, em



06/03/2025, às 19:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Toledo Ribas, Professor do Magistério Superior**, em 07/03/2025, às 06:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 07/03/2025, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4020130** e o código CRC **E186396D**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Valéria e José Luiz, ao meu irmão João Henrique e à minha cunhada Brenda por todo o suporte durante minha trajetória acadêmica, por compreenderem e acreditarem no poder da ciência e por me incentivarem a conquistar meus sonhos.

Agradeço também aos meus amigos do Ensino Fundamental, Médio e da Graduação por me acompanharam durante todos esses anos, pelas conversas e pelo apoio.

Ao meu Prof. Orientador Vinicius Ribas por me receber em seu grupo de pesquisa ainda no início da Graduação e por me permitir fazer parte da construção de um projeto tão fantástico. Muito obrigada pela orientação presente e cuidadosa, por compartilhar seus conhecimentos, por acreditar no meu potencial e me incentivar a buscar novos desafios.

Agradeço também aos colegas e amigos que fizeram ou fazem parte do Ribas Team (Raquel Almeida, Victor Matos, Maria Clara Fernandes, Júlia Gomes, Pedro Marzano, Paloma Farias, Clarissa Cyrino, Betânia Alvarenga, Maria Carolina Silva e Tales da Silva) pelas experiências compartilhadas no laboratório, pelo companheirismo e por todas as contribuições.

Aos demais colegas e professores do Laboratório de Neurobiologia Prof^a Conceição Machado que de alguma forma contribuíram para essa jornada.

Ao professor Uwe Michel pela colaboração na produção dos vetores virais utilizados neste trabalho e ao Pós-doutorando Lucas Caldi-Gomes pelas contribuições nas análises de bioinformática.

À professora Érika Jorge e à Pós-doutoranda Júlia Nogueira por nos auxiliar na realização dos ensaios de viabilidade celular.

Finalmente, agradeço às agências de fomento, sobretudo, à FAPEMIG, que me permitiram realizar esse projeto de pesquisa e conduzir o Mestrado.

RESUMO

O sistema nervoso central (SNC) de mamíferos adultos é caracterizado por apresentar propriedades intrínsecas e extrínsecas que limitam a regeneração de axônios. Em resposta a uma lesão, as células neuronais podem ter suas funções comprometidas de forma permanente, como ocorre em distúrbios neurodegenerativos. Dessa forma, é essencial buscar por estratégias que atenuem ou revertam esses danos, como a promoção da neuroproteção e regeneração axonal. Para isso, é possível adotar técnicas que modulem a capacidade intrínseca neuronal, mecanismo associado à expressão gênica e amplamente investigado no desenvolvimento de terapias gênicas. Nesse sentido, uma alternativa terapêutica consiste na regulação da expressão gênica utilizando microRNAs, pequenos RNAs não codificantes que atuam como silenciadores pós-transcricionais, a partir do uso de vetores virais. Neste trabalho, investigamos o papel do miR-22, um importante regulador da sobrevivência neuronal, na degeneração e regeneração axonal após lesão no SNC. Para isso, vetores de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) expressando o miR-22 e a proteína fluorescente mCherry (rAAV.miR-22) e um vetor controle expressando apenas a proteína mCherry (rAAV.CTRL) foram usados. Primeiramente foram realizados ensaios de viabilidade celular e eficiência de transdução dos vetores de rAAV em cultura de neurônios corticais primários. Em seguida, verificamos se o rAAV.miR-22 seria capaz de modular a arborização, crescimento e regeneração de neuritos. Avaliamos também, utilizando câmaras microfluídicas, se o rAAV.miR-22 seria capaz de promover regeneração axonal e de proteger neurônios da degeneração. Finalmente, análises de bioinformática para identificar os alvos preditos e validados do miR-22 e análises funcionais foram realizadas. A partir dos resultados obtidos, foi observado que os vetores de rAAV produzidos apresentam alta eficiência de transdução neuronal e não há citotoxicidade diferencial entre o rAAV.CTRL e o rAAV.miR-22. Para as análises de arborização e crescimento de neuritos também não foram observadas diferenças significativas entre rAAV.CTRL e rAAV.miR-22. Os ensaios de regeneração de neuritos, por outro lado, revelaram que rAAV.miR-22 aumenta a regeneração de neuritos. Ao avaliarmos a regeneração axonal, foi observado que o rAAV.miR-22 promove também um aumento na regeneração axonal após axotomia. As análises de degeneração axonal, no entanto, mostram que o rAAV.miR-22 não apresenta efeito significativo neste processo. Por fim, as análises de bioinformática revelaram que o miR-22 apresenta 34 alvos validados e 330 alvos preditos, os quais, de acordo com as análises funcionais, estão associados a processos importantes na

neurodegeneração. Dessa forma, este estudo permite uma melhor compreensão sobre o papel do miR-22 e o aponta como um potencial alvo terapêutico para promoção da regeneração axonal e reparo do SNC.

Palavras-chave: regeneração axonal; vírus adeno-associado; microRNA; neurodegeneração.

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) of adult mammals is characterized by having intrinsic and extrinsic properties that inhibit axon regeneration. When an injury occurs, neuronal cells can have their functions permanently compromised, as observed in neurodegenerative disorders. In this sense, it is essential to search for strategies that mitigate or reverse this damage, such as promoting neuroprotection and axonal regeneration. To achieve this, it is possible to adopt techniques that modulate intrinsic neuronal capacity, a mechanism associated with gene expression and widely investigated in the development of gene therapies. A therapeutic alternative consists of regulating gene expression using microRNAs, small non-coding RNAs that act as post-transcriptional silencers, through the use of viral vectors. In this work, we investigated the role of miR-22, an important regulator of neuronal survival, in axonal degeneration and regeneration after CNS injury. For this, recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors expressing miR-22 and the fluorescent protein mCherry (rAAV.miR-22) and a control vector expressing only the mCherry protein (rAAV.CTRL) were used. First, cell viability and transduction efficiency assays of viral vectors were carried out in primary culture of cortical neurons. Next, we verified whether the rAAV.miR-22 would be capable of modulating neurite arborization, growth and regeneration. We also evaluated, using microfluidic chambers, whether the rAAV.miR-22 would be able to promote axonal regeneration and protecting neurons from degeneration. Finally, bioinformatics analyzes to identify the predicted and validated targets of miR-22 and functional analyzes were performed. From the results obtained, it was observed that the rAAV vectors presented high neuronal transduction efficiency and there was no differential cytotoxicity between the rAAV.CTRL and the rAAV.miR-22. For the analyzes of neurite outgrowth and arborization, no significant differences were observed between rAAV.CTRL and rAAV.miR-22. Neurite regeneration assays, in contrast, revealed that rAAV.miR-22 increases neurite regeneration. When evaluating axonal regeneration, it was observed that overexpression of miR-22 also promotes axonal regeneration. Axonal degeneration analyses, however, showed that rAAV.miR-22 had no significant effect on this process. Finally, bioinformatics analyzes revealed that miR-22 has 34 validated targets and 330 predicted targets, which, according to functional analyses, are associated with important processes in neurodegeneration. Therefore, this study allows a better understanding of the role of miR-22 and points to it as a potential therapeutic target for promoting axonal regeneration and CNS repair.

Keywords: axonal regeneration; adeno-associated virus; microRNA; neurodegeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de degeneração axonal no SNC	20
Figura 2 - Biogênese dos miRNAs e silenciamento gênico	26
Figura 3 - Transdução celular por AAV	30
Figura 4 - Mapa e titulação dos vetores virais.....	34
Figura 5 - Câmara microfluídica	39
Figura 6 - Transdução de neurônios corticais primários utilizando rAAV.CTRL e rAAV.miR-22	43
Figura 7 - Efeito do rAAV.miR-22 no crescimento de neuritos.	45
Figura 8 - Efeito do rAAV.miR-22 na complexidade da arborização de neuritos	46
Figura 9 - Avaliação do efeito do rAAV.miR-22 na regeneração de neuritos	48
Figura 10 - Avaliação do efeito do rAAV.miR-22 na regeneração axonal.....	50
Figura 11 - Análise do efeito do rAAV.miR-22 na degeneração axonal	52
Figura 12 - Análises de enriquecimento funcional para os alvos preditos do miR-22.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alvos validados do miR-22.	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV – Vírus adeno-associado (do inglês *Adeno-associated virus*)

Ago2 – Argonauta 2

AKT – Proteína cinase B (do inglês *Protein kinase B*)

APP – Precursor da proteína amiloide (do inglês *Amyloid precursor protein*)

A β – Amiloide beta

BACE1 – Enzima de clivagem da proteína precursora de amiloide do sítio beta 1 (do inglês *Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*)

Bax – Proteína X associada a Bcl-2 (do inglês *Bcl-2-associated X protein*)

Bcl-2 - Proteína de leucemia/linfoma 2 de células B (do inglês *B-cell leukemia/lymphoma 2 protein*)

C. elegans - *Caenorhabditis elegans*

Ca²⁺ - Cálcio

CAPI- Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

CASP3 – Caspase 3

CBL – Linfoma de linhagem B de Casitas (do inglês *Casitas B-lineage Lymphoma*)

CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CGRs – Células ganglionares da retina

CRISPR – Repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

CSPGs – Proteoglicanos de sulfato de condroitina (do inglês *Chondroitin Sulfate Proteoglycan*)

DAA – Degeneração Axonal Aguda

DALY – Ano de vida ajustado por incapacidade (do inglês *Disability-adjusted life year*)

DDIT4 – Transcrito 4 induzível por dano ao DNA (do inglês *DNA damage-inducible transcript 4*)

DGCR8 – Gene 8 da região crítica da síndrome de DiGeorge (do inglês *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*)

DIV – Dia *in vitro*

dMAG - Glicoproteína associada à mielina degradada (do inglês *Degraded myelin-associated glycoprotein*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

E18 – 18 dias embrionários

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês *Epidermal growth factor receptor*)

eIF4E - Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (do inglês *Eukaryotic translation initiation factor 4E*)

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

ERK1/2 – Cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (do inglês *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*)

Exp5 – Exportina 5

FDA - do inglês *Food and Drug Administration*

GAP43 – Proteína associada ao crescimento 43 (do inglês *Growth-associated protein 43*)

HDAC – Histona desacetilase

HDCA4 - Histona desacetilase 4

hSyn – Sinapsina humana (do inglês *Human synapsin*)

ITR - Repetições terminais invertidas (do inglês *Inverted terminal repeats*)

JAK – Janus cinase (do inglês *Janus kinase*)

JNK – Cinase c-Jun N-terminal (do inglês *c-Jun N-terminal kinase*)

KLF – Fator de transcrição semelhante a Krüppel (do inglês *Krüppel-like factor*)

MAG – Glicoproteína associada à mielina (do inglês *Myelin-associated glycoprotein*)

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*)

MAPK10 - Proteína cinase 10 ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen-activated protein kinase 10*)

MAPK14/p38 - Proteína cinase 14 ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen-activated protein kinase 14*)

miRISC – Complexo de silenciamento induzido por miRNA (do inglês *miRNA-induced silencing complex*)

miRNA – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês *Mammalian target of rapamycin*)

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

NF-κB – Fator nuclear kappa B (do inglês *Nuclear factor kappa B*)

nm – Nanômetro

OMgp – Glicoproteína oligodendrócito-mielina (do inglês *Oligodendrocyte myelin glycoprotein*)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate-buffered saline*)

PFA – Paraformaldeído

pHelper – Plasmídeo helper

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês *Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PLL – Poli-l-lisina

PLO – Poli-l-ornitina

Poli-A - Poliadenilação

pre-miRNA – miRNA precursor

pri-miRNA – miRNA primário

PSN - Penicilina-Estreptomicina-Neomicina (do inglês *Penicillin-Streptomycin-Neomycin*)

PTEN – Fosfatase homóloga à tensina (do inglês *Phosphatase and tensin homolog*)

rAAV - Vírus adeno-associado recombinante (do inglês *Recombinant adeno-associated virus*)

RAGs – Genes associados à regeneração (do inglês *Regeneration associated genes*)

Rcor1 - REST corepressor 1

Rgs2 - Regulador da sinalização da proteína G2 (do inglês *Regulator of G-protein signaling 2*)

RhoA - Membro da família homóloga Ras A (do inglês *Ras homolog family member A*)

RISC - Complexo silenciamento induzido por RNA (do inglês *RNA-induced silencing complex*)

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid*)

RNase – Ribonuclease

ROCK – Proteína cinase associada a Rho (do inglês *Rho associated protein kinase*)

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

RTP801/REDD1 – Resposta a danos no DNA 1 (do inglês *DNA damage response 1*)

SE – Status epilepticus

Sema4A – Semaforina 4A

SemaW/Sema4F – Semaforina 4F

siRNA – Pequeno RNA de interferência (do inglês *Small interfering RNA*)

SMN1 – Neurônio motor de sobrevivência 1 (do inglês *Survival motor neuron 1*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SOCS3 – Supressor da sinalização de citocinas 3 (do inglês *Suppressor of Cytokine Signaling 3*)

SOX11 – Fator de transcrição SRY-BOX 11

SOX9 – Fator de transcrição SRY-Box 9 (do inglês *SRY-Box Transcription Factor 9*)

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRBP - Proteína de ligação ao RNA de resposta de transativação (do inglês *Transactivation response RNA-binding protein*)

TRPM7 - Potencial de receptor transitório melastatina 7 (do inglês *Transient receptor potential melastatin 7*)

TSC1 / 2– Complexo de esclerose tuberosa 1 ou 2 (do inglês *Tuberous sclerosis complex 1 or 2*)

Tuj-1 – Beta-tubulina classe III (do inglês *Class III beta-tubulin*)

UTR – Região não traduzida (do inglês *Untranslated region*)

WHO – do inglês *World Health Organization*

µl – Microlitro

µm – Micrograma

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Neurodegeneração	18
1.1.2 Regeneração axonal: fatores intrínsecos e extrínsecos	20
1.2 MicroRNA	24
1.2.1 Biogênese dos miRNAs e silenciamento gênico	24
1.2.2 miR-22 e distúrbios neurodegenerativos	26
1.3 Vírus adeno-associado	29
2. Justificativa	32
3. Objetivos	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos	33
4. Métodos	33
4.1 Produção dos vetores virais	33
4.2 Cultura de neurônios corticais primários	34
4.3 Eficiência de transdução dos vetores de rAAV	35
4.4 Teste de viabilidade celular	36
4.5 Imunofluorescência	37
4.6 Crescimento de neuritos <i>in vitro</i>	37
4.7 Análise da arborização de neuritos <i>in vitro</i>	37
4.8 Regeneração de neuritos após lesão do tipo <i>scratch in vitro</i>	38
4.9 Cultura neuronal em câmara microfluídica	38
4.10 Análise de regeneração e degeneração axonal por imageamento em tempo real de neurônios corticais plaqueados em câmara microfluídica	40
4.11 Análises estatísticas	40
4.12 Análises de bioinformática	41
5. Resultados	42
5.1 rAAV.miR-22 transduz eficientemente neurônios corticais primários <i>in vitro</i> sem promover citotoxicidade em comparação com rAAV.CTRL	42
5.2 rAAV.miR-22 não tem efeito no crescimento e arborização de neuritos	44
5.3 rAAV.miR-22 aumenta a regeneração de neuritos após lesão do tipo <i>scracth</i>	47
5.4 Regeneração axonal de neurônios cultivados em câmaras microfluídicas é aumentada pelo rAAV.miR-22	49

5.5 rAAV.miR-22 não interfere na degeneração axonal após axotomia de neurônios cultivados em câmaras microfluídicas	51
5.6 Análises de bioinformática para identificar possíveis mecanismos associados com os efeitos do rAAV.miR-22	53
6. Discussão.....	55
6.1 MiR-22: arborização, crescimento e regeneração de neuritos, regeneração e degeneração axonal.....	56
6.2 MiR-22: análises de bioinformática e de enriquecimento funcional	58
6.2.1 Componentes celulares.....	58
6.2.2 Funções moleculares.....	60
6.2.3 Processos biológicos.....	61
6.2.4 Alvos do miR-22 e outros efeitos biológicos	62
7. Conclusão	64
8. Referências bibliográficas.....	66
9. Anexos.....	78

1. Introdução

1.1 Neurodegeneração

A neurodegeneração é caracterizada pela perda progressiva de neurônios e consequente perda de funções neurológicas (Fierini, 2020; Nature portfolio, 2024). Este processo é característico de distúrbios neurodegenerativos que englobam as doenças neurodegenerativas crônicas como o glaucoma e as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, e também as lesões traumáticas, como a lesão da medula espinhal e lesão crânio encefálica. Estes distúrbios geralmente são marcados pela morte neuronal, que pode ser associada a diferentes mecanismos, como transporte axonal dificultado, disfunção mitocondrial e lisossomal, disfunção sináptica, estresse oxidativo, aumento do cálcio intracelular, excitotoxicidade, ativação exacerbada da micróglia, formação de agregados proteicos, atrofia somática, entre outros (Bredesen; Rao; Mehlen, 2006; Andreone; Larhammar; Lewcock, 2020).

A morte de células neuronais, no entanto, é um processo tardio na neurodegeneração e geralmente ocorre após a degeneração axonal. Diante de uma lesão axonal no sistema nervoso central (SNC), por exemplo, uma cascata de sinalização é desencadeada, levando à fragmentação do axônio tanto na região proximal quanto na distal em relação à lesão (Knöferle *et al.*, 2010). Primeiramente, há um rápido influxo de cálcio no axônio, desencadeando a ativação de calpaínas, proteases que provocam a clivagem de proteínas do citoesqueleto. Desse modo, a desestabilização do citoesqueleto compromete o transporte axonal, levando ao acúmulo de organelas no axoplasma e à formação de inchaços axonais, que contribuem para a degeneração do axônio (Lingor *et al.*, 2012; Hill, 2017).

A degeneração axonal causada por uma lesão focal é um processo que acontece em diferentes estágios: degeneração axonal aguda (DAA), degeneração retrógrada (*dieback*) e degeneração Walleriana (Singh *et al.*, 2017). A DAA compreende uma rápida desintegração do axônio, em suas porções distal e proximal, que ocorre nas primeiras horas após uma lesão traumática no SNC (Knöferle *et al.*, 2010; Lingor *et al.*, 2012). A degeneração axonal retrógrada ou *dieback* é caracterizada pela retração da porção proximal dos axônios lesionados e formação de bulbos de retração que dificultam a regeneração (Shahsavani; Kataria; Karimi-Abdolrezaee, 2021). Esta pode ser dividida ainda em degeneração axonal retrógrada lenta que corresponde à lenta retração das terminações axonais do local da lesão,

podendo também ser observado inchaço axonal e formação de bolhas axonais. E em uma segunda fase da degeneração, algumas semanas após a lesão, ocorre a degeneração axonal retrógrada mediada por macrófagos, na qual há a infiltração de células inflamatórias e atividade fagocítica para limpeza do local da lesão (Evans *et al.*, 2014; Hill, 2017; Shahsavani; Kataria; Karimi-Abdolrezaee, 2021). Finalmente, na porção distal do axônio, ocorre a degeneração Walleriana que corresponde à um rápido processo de fragmentação de toda a porção distal do axônio já desconectado do corpo celular (Dziedzic *et al.*, 2010; Simons; Misgeld; Kerschensteiner, 2014) (Figura 1).

Após a degeneração axonal e consequente comprometimento das conexões neuronais, os neurônios podem passar pelo processo de morte celular, geralmente via apoptose, morte celular autofágica ou necrose. A apoptose é um tipo de morte celular programada que pode ser iniciada por fatores intrínsecos, como danos ao DNA ou regulação positiva de fatores pró-apoptóticos e por fatores extrínsecos, como ativação de receptores TNF (fator de necrose tumoral). Ambas as vias são responsáveis por alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial, desencadeando a liberação, por exemplo, de citocromo C, proteína que atua na ativação de caspases que contribuem para a morte celular (Kumar; Herbert; Warrens, 2005; Chi; Chang; Sang, 2018).

A autofagia é um processo essencial para a manutenção da homeostase celular e compreende a degradação de agregados proteicos e de componentes celulares danificados ou obsoletos presentes no citoplasma por lisossomos e autofagossomos (Nixon, 2013). O desajuste do processo autofágico é uma característica comum a alguns distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer, no qual usualmente há uma redução da taxa de autofagia, resultando no acúmulo de autofagossomos em neuritos distróficos (Komatsu *et al.*, 2006; Nixon e Yang, 2011). Em outros contextos, no entanto, como lesão axonal mecânica, a autofagia se torna aumentada, contribuindo para a degeneração axonal (Ribas *et al.*, 2015; Vahsen *et al.*, 2020). Além disso, a morte celular autofágica é descrita em diferentes situações de neurodegeneração e tem como característica um aumento da autofagia (Fricker *et al.*, 2018).

Já a necrose é um tipo de morte celular aguda que pode ser causada por diferentes fatores estressantes que levam, por exemplo, ao influxo excessivo de cálcio e à ativação de calpaínas (Liu *et al.*, 2014). Ademais, é caracterizada pela perda de ATP, inchaço mitocondrial, vacuolização do citoplasma e consequente lise da célula. Com a liberação do

conteúdo celular, esse tipo de morte neuronal também pode afetar células vizinhas ao induzir uma inflamação (Syntichaki e Tavernarakis, 2003; Gorman, 2008).

Mesmo nos casos em que a degeneração axonal não é sucedida pela morte celular, as conexões neuronais são interrompidas e, portanto, estas células tornam-se incapazes de conduzir impulsos nervosos. Portanto, para que o neurônio retome suas funções, é necessário que ocorra a regeneração axonal.

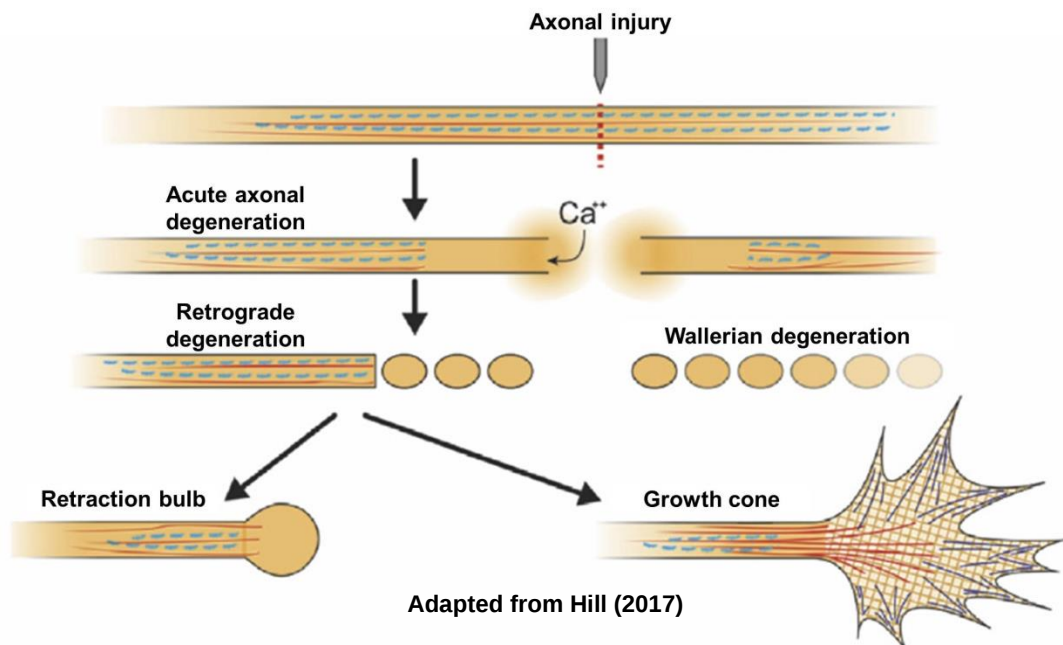


Figura 1 - Mecanismos de degeneração axonal no SNC. Após uma lesão axonal no SNC o axônio passa por um processo de degeneração. Nos primeiros minutos se inicia um influxo de cálcio que será o principal responsável por iniciar a degeneração axonal aguda (DAA) que acomete as porções distal e proximal do axônio. Posteriormente, a porção proximal do axônio passa pela degeneração retrógrada que poderá resultar na formação de bulbos de retração. A porção distal do axônio, por outro lado, passa por degeneração Walleriana. Para que uma regeneração axonal ocorra seria necessário que o bulbo de retração se transformasse em um cone de crescimento, o que não acontece de forma espontânea no SNC.

1.1.2 Regeneração axonal: fatores intrínsecos e extrínsecos

Os axônios de neurônios do SNC de mamíferos adultos têm limitada capacidade de regeneração diante de uma lesão traumática ou de um distúrbio neurodegenerativo, por exemplo, ao contrário do que pode ser observado no SNC de peixes, anfíbios ou no sistema nervoso periférico e no SNC embrionário de mamíferos (Echeverri, 2020). O crescimento axonal após uma lesão deve ocorrer de forma polarizada, guiado pelos cones de crescimento, assim como é observado durante os estágios embrionários (Nakajima *et al.*, 2024). Além disso, com o aumento do tamanho corporal no adulto, é preciso que os axônios cresçam por maiores distâncias e estejam hábeis a transportar nutrientes, organelas e outros materiais do

corpo celular para o terminal axonal e a restabelecer conexões sinápticas (He e Jin, 2016). Entretanto, fatores extrínsecos e intrínsecos aos neurônios maduros do SNC dificultam a regeneração e recuperação funcional destas células após uma lesão.

No SNC lesionado fatores extrínsecos criam barreiras físicas e bioquímicas que dificultam a regeneração. A principal barreira física formada no tecido lesionado é a cicatriz glial, constituída, sobretudo, por astrócitos reativos e debris de mielina que são responsáveis pela regulação positiva de proteoglicanos e inibidores associados à mielina que atuam como barreiras bioquímicas (Silver e Miller, 2004; Ohtake e Li, 2015).

Os Proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs), por exemplo, são componentes da matriz extracelular que se ligam a receptores da membrana neuronal e desencadeiam alterações em vias de sinalização intracelular, como inativação da via da Akt, provocando a inibição da regeneração axonal e indução da apoptose retrógrada (Hu *et al.*, 2021; Hu; Jin; Selzer, 2022). Os inibidores associados à mielina também são partes fundamentais do microambiente não permissivo à regeneração no SNC adulto. A proteína Nogo, por exemplo, pertencente à família dos reticulons e expressa por oligodendrócitos, quando regulada negativamente em modelo de lesão da medula espinhal, apresenta robusto efeito regenerativo de axônios do trato corticoespinhal, além de maior e mais rápida recuperação funcional e motora (Grandpré *et al.*, 2000; Simonen *et al.*, 2003; Liebscher *et al.*, 2005; Buchli e Schwab, 2005). Outro componente inibitório é a Glicoproteína associada à mielina (MAG), relacionada à formação da estrutura da bainha de mielina e ao contato entre axônio e glia. A bainha de mielina, ao ser danificada, libera fatores que inibem a regeneração, como a dMAG (fragmento proteolítico de MAG), que podem se difundir pelo SNC, afetando também neurônios que não estejam diretamente em contato com os debris de mielina (Tang *et al.*, 2001; Mckerracher e Rosen, 2015). O terceiro componente é a Glicoproteína oligodendrócito-mielina (OMgp) responsável por mediar a adesão entre membranas de oligodendrócitos ou entre oligodendrócitos e axônios nos nodos de Ranvier (Mikol; Gulcher; Stefansson, 1990). Em cultura neuronal OMgp inibe o crescimento neurítico a partir da ativação da via RhoA e em modelo *in vivo* a deleção de seu gene codificador promove brotamento axonal e recuperação funcional após lesão no SNC (Wang *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2008). Finalmente, a deleção simultânea de Nogo, MAG e OMgp em modelo *in vivo* apresenta maior regeneração axonal e melhora da capacidade locomotora quando comparado à deleção individual destes fatores (Cafferty *et al.*, 2010).

Entre os fatores intrínsecos que limitam a regeneração no SNC está a regulação da expressão gênica via modificações epigenéticas. Ao longo do desenvolvimento do SNC, neurônios lesionados perdem a capacidade de reexpressar genes associados à regeneração (RAGs). Neste caso, alterações na estrutura da cromatina, como redução da acetilação de histonas e regulação negativa de metiltransferases, restringem o acesso de fatores de transcrição às regiões promotoras de RAGs, impedindo a expressão desses genes e, consequentemente, inibindo a regeneração (Venkatesh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024).

É fundamental destacar também o papel de genes que, em neurônios maduros e em contexto de lesão neuronal, têm sua expressão aumentada e afetam o processo regenerativo (Varadarajan *et al.*, 2022). A Fosfatase homóloga à tensina (PTEN) e o Complexo de esclerose tuberosa 1 (TSC1), por exemplo, são genes identificados como reguladores negativos do crescimento axonal no SNC lesionado. Estes genes atuam suprimindo, sobretudo, a via da mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), uma serina-treonina cinase responsável por controlar diversas funções celulares nos mamíferos e que no sistema nervoso está associada ao desenvolvimento neuronal, crescimento, diferenciação e sobrevivência de neurônios, fisiologia neuronal e plasticidade sináptica (Switon *et al.*, 2017; Ding e Chen, 2022). Em neurônios axotomizados adultos o silenciamento de PTEN e TSC1 promove a reativação dessa via e induz a regeneração de axônios de células ganglionares da retina (CGRs) em modelo de esmagamento do nervo óptico (Park *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2010) revelam ainda que a deleção apenas de PTEN, também permite a regeneração axonal de neurônios corticoespinhais e o reestabelecimento de sinapses após lesão da medula espinhal.

Smith *et al.* (2009) mostram que a deleção de outro gene, o Supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), cuja expressão é regulada positivamente em neurônios lesionados e que atua como inibidor da via JAK/STAT3 (Park; Lin; Lee, 2014), também é capaz de promover a sobrevivência neuronal e regeneração axonal em CGRs. Complementarmente, Sun *et al.* (2011) mostram que a co-deleção de PTEN e SOCS3, e consequente modulação simultânea das vias mTOR e JAK/STAT3, é capaz de promover a regeneração de um maior número de axônios quando comparado à deleção dos genes individualmente, permitindo também que esses axônios cresçam por maiores distâncias, chegando à entrada do trato óptico e ao hipotálamo.

Os fatores semelhantes a Krüppel (KLFs) também são uma família de fatores de transcrição importantes na regulação do crescimento axonal no SNC. Em CGRs, no período

pós-natal, KFLs que promovem a regeneração são regulados negativamente, enquanto aqueles que inibem a regeneração têm sua expressão aumentada (Moore *et al.*, 2009). KLF4, por exemplo, é um fator de transcrição que atua como uma barreira para regeneração axonal ao se ligar ao Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3) e inibir JAK/STAT3, via que está diretamente associada à regeneração no SNC (Qin; Zou; Zhang, 2013; Mehta *et al.*, 2016).

Rho, membro da família Ras de pequenas GTPases, também apresenta funções fundamentais no SNC, sendo associado à retração de neuritos (Katoh *et al.*, 1998). Rho e a proteína cinase associada a Rho (ROCK) participam da regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e de cones de crescimento. Em células neuronais a inibição de um destes componentes pode induzir o aumento do tamanho e da motilidade de cones de crescimento, contribuindo para o alongamento de axônios (Bito *et al.*, 2000). Além disso, a inativação da via de sinalização Rho é capaz de promover a regeneração de axônios em substratos inibitórios *in vitro*, em modelo de lesão do nervo óptico e em modelo de lesão da medula espinhal, sendo neste caso observada também uma melhora da habilidade locomotora dos animais tratados (Lehmann *et al.*, 1999; Dergham *et al.*, 2002).

Outro importante fator que tem sido associado à capacidade intrínseca de regeneração neuronal é o fator de transcrição SRY-Box 11 (SOX11), gene que interage com diferentes vias de sinalização exercendo papel na neurogênese e no desenvolvimento neuronal (Hoshiba *et al.*, 2016). Em modelo de lesão do nervo óptico, a superexpressão de SOX11 promove a regeneração axonal em alguns tipos de CGRs a partir da ativação de genes associados ao remodelamento do citoesqueleto e crescimento axonal, no entanto, em outros tipos de CGRs pode levar à morte celular (Norsworthy *et al.*, 2017).

Dada a importância dos fatores extrínsecos e intrínsecos no SNC lesionado, é importante adotar estratégias que sejam capazes de modular estes componentes. A regulação de fatores epigenéticos, o aumento da transcrição de genes pró-regenerativos e a diminuição da expressão de genes que inibem a regeneração, por exemplo, são essenciais para o reparo e indução de uma resposta regenerativa em axônios danificados. Nesse sentido, os microRNAs, surgem como moléculas promissoras para o desempenho destas funções, uma vez que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica.

1.2 MicroRNA

Em 1993 Lee *et al.* descreveram o primeiro representante da classe dos microRNAs, o gene *lin-4*, responsável por controlar o tempo de desenvolvimento larval de *C. elegans*, mas cujo RNA não era capaz de codificar proteínas (Bartel, 2004). Os miRNAs, desde então, foram caracterizados em diferentes grupos animais, como nematódeos, insetos e mamíferos e em muitos destes mostraram-se filogeneticamente conservados (Ambros, 2004). Estes pequenos RNAs não codificantes com aproximadamente 22 nucleotídeos atuam pós-transcricionalmente na regulação da expressão gênica, degradando o mRNA ou bloqueando a tradução (Lee *et al.*, 2004). Além disso, têm a capacidade de se ligar a múltiplos mRNA alvos e um único alvo pode ser modulado por diversos miRNAs (Lewis *et al.*, 2003; Jovicic *et al.*, 2013). Dessa forma, exercem importantes funções em diferentes vias regulatórias, como diferenciação e proliferação celular, apoptose e controle temporal do desenvolvimento (Bartel, 2004).

No SNC os miRNAs são necessários para o desenvolvimento de células tronco e células progenitoras neurais e estão associados à proliferação neuronal, neurogênese, crescimento dendrítico, formação de espinhos dendríticos e plasticidade neuronal. Ademais, muitos miRNAs estão envolvidos com a progressão de distúrbios neurodegenerativos e, por isso, também podem ser utilizados com biomarcadores para algumas destas condições (Hutchison; Okun; Mattson, 2009; Li; Lei; Sun, 2023).

1.2.1 Biogênese dos miRNAs e silenciamento gênico

A biogênese dos microRNAs se inicia no núcleo da célula, onde um gene de miRNA é transcrito em miRNA primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II ou III (Winter *et al.*, 2009). Este pri-miRNA apresenta uma estrutura *stem loop* terminada em formato de grampo (*hairpin shape*) que é clivada por um microprocessador nuclear formado pela enzima Drosha RNase III e por duas unidades da proteína DGCR8 (do inglês *DiGeorge critical region 8*) e, dessa forma, é liberado o miRNA precursor (pré-miRNA) composto por aproximadamente 70 nucleotídeos (Lee *et al.*, 2003, Shang *et al.*, 2023). O pré-miRNA é exportado para o citoplasma por um complexo formado pelas proteínas Exportina-5 (Exp5) e Ran-GTP (Okada *et al.*, 2009). No citoplasma, a RNase Dicer e a proteína TRBP (do inglês *TAR RNA binding protein*) formam um complexo que se liga ao pré-miRNA exportado, constituindo o complexo de carregamento RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*). Ao se ligar ao pré-miRNA, a Dicer cliva seu *loop* terminal, produzindo um duplex de miRNA de aproximadamente 22 nucleotídeos (Winter *et al.*, 2009; Gebert e MacRae, 2019). Uma fita

deste duplex é então degradada por uma nuclease, enquanto a outra fita permanece como um miRNA maduro (Lee *et al.*, 2004).

Após a biogênese do miRNA, a fita madura restante é incorporada ao Complexo de Silenciamento Induzido por miRNA (miRISC) formado pelas proteínas do complexo RISC (Dicer e TRBP) e por uma proteína da família Argonauta, geralmente Ago2 (Jungers e Djuranovic, 2022). O silenciamento de genes alvos mediado pelo miRISC ocorre, predominantemente, a nível pós-transcricional e é iniciado a partir do pareamento de bases entre o complexo formado pelo miRNA e o seu mRNA alvo, que pode apresentar uma sequência integralmente ou parcialmente complementar. Nesta etapa, a região *seed* do miRNA, um fragmento de 2 a 8 nucleotídeos localizado em sua extremidade 5', se emparelha geralmente com a região 3' UTR do mRNA alvo, desencadeando seu silenciamento a partir de sua degradação ou repressão da tradução (Filipowicz; Bhattacharyya; Sonenberg, 2008; Huntzinger e Izaurralde, 2011; O'brien, 2018).

A degradação do mRNA pode acontecer por clivagem do mRNA por endonucleases, quando este apresenta uma sequência de bases totalmente complementar ao miRNA, ou por deadenilação, remoção da 3' cauda poli-A do mRNA, e consequente decapeamento da extremidade 5', expondo esta região à ação de exonucleases (Wu e Belasco, 2008; Molasy *et al.*, 2017). Por outro lado, a repressão da tradução pode ocorrer por competição da proteína Ago2 com o fator de iniciação da tradução eIF4E ao se ligar à estrutura Cap do mRNA ou por bloqueio da associação de subunidades ribossômicas essenciais para o início da tradução, por exemplo (Wu e Belasco, 2008) (Figura 2).

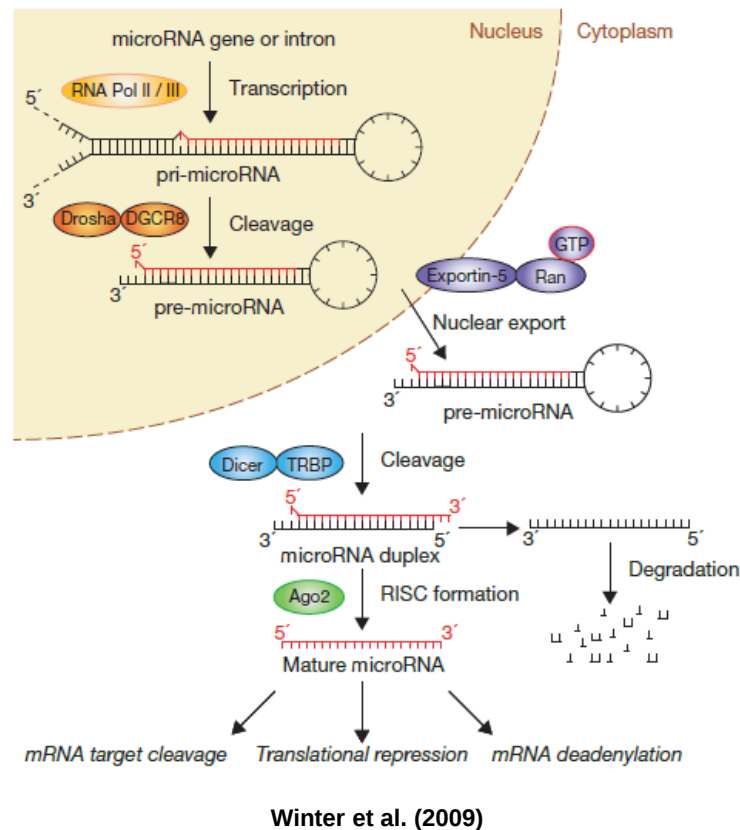


Figura 2 - Biogênese dos miRNAs e silenciamento gênico. A biogênese do miRNA se inicia no núcleo, onde um gene de miRNA é transcrito em miRNA primário (pri-miRNA). Este passa por clivagem liberando o miRNA precursor (pré-miRNA). Com o auxílio da Exportina-5-Ran-GTP o pre-miRNA é exportado do núcleo. No citoplasma, o pre-miRNA se associa ao complexo RISC e sua estrutura *hairpin* é clivada, resultando na formação do miRNA duplex. Uma fita deste miRNA é degradada e a outra fita, madura, se associa ao complexo miRISC. Esta associação inicia o processo de silenciamento gênico, a partir da repressão da tradução, degradação ou deadenilação de um mRNA alvo.

1.2.2 miR-22 e distúrbios neurodegenerativos

O microRNA-22-3p é um miRNA exônico descoberto primeiramente em células HeLa (Ali *et al.*, 2020). Este miRNA está localizado no cromossomo 17 no segundo éxon do gene MGC14376 e pode ser encontrado em diversos tecidos humanos, como o cérebro, em células neuronais e células da glia (Rodriguez *et al.*, 2004; Yamakuchi *et al.*, 2011; Jimenez-Mateos *et al.*, 2015). O miR-22, assim como os demais miRNAs, é capaz de se ligar a diferentes alvos e, por isso, é responsável por regular uma variedade de vias celulares e processos biológicos. Essa característica, frequentemente, faz com que estas moléculas estejam associadas, por exemplo, ao desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos e neurológicos, como as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington e Epilepsias.

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo e é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra pars compacta e pelo dobramento incorreto e agregação anormal da proteína alfa-

sinucleína em Corpos de Lewy (Deliz; Tanner; Gonzalez-Latapi, 2024). Um estudo de Yang *et al.* (2016) utilizando modelo *in vitro* de Doença de Parkinson (Células de feocromocitoma - PC12 tratadas com a neurotoxina 6-Hidroxi dopamina) demonstrou uma significativa redução na expressão do miR-22 neste modelo, assim como já havia sido observado em pacientes com Parkinson por Margis *et al.* (2011). Além disso, nesse estudo, a superexpressão do miR-22 apresentou um efeito citoprotetor, aumentando a sobrevivência e proliferação celular, e reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, a atividade de caspases-3 e a apoptose das células PC12 tratadas. Foi sugerido ainda, que os efeitos observados seriam resultantes da regulação negativa do gene TRPM7 (do inglês *Transient receptor potential melastatin 7*), alvo do miR-22 associado, por exemplo, à mediação da morte neuronal anóxica (Aarts *et al.*, 2003).

Estudos recentes também têm buscado avaliar a relação do miR-22 com a Doença de Alzheimer. Esta é uma doença neurodegenerativa progressiva responsável por aproximadamente 60-70% dos casos de demência no mundo (World Health Organization, 2023). A doença é caracterizada pelo acúmulo extraneuronal de placas senis compostas, sobretudo, pelo peptídeo beta amiloide, e pela formação de emaranhados neurofibrilares a partir da hiperfosforilação da proteína Tau no neocórtex, hipocampo e outras regiões subcorticais do cérebro, resultando em degeneração e morte neuronal (Lloret *et al.*, 2015; Idda *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2018) utilizando modelo de degeneração induzido por injeção de β -amiloide, buscaram investigar os efeitos da superexpressão do miR-22 nestes animais. Alguns dos resultados apresentados mostraram que o miR-22 é capaz de reverter a perda de estruturas sinápticas no hipocampo de ratos utilizados como modelo, pode contribuir significativamente para a redução da apoptose neuronal e para a melhora do aprendizado e distúrbio de memória neste grupo. Em outro estudo, Xie, Xie e Chen (2024) utilizando linhagem celular de neuroblastoma (SK-N-SH) tratada com β -amiloide demonstraram que a superexpressão de miR-22-3p contribui para a redução das taxas de apoptose, de proteínas pró-apoptóticas e de fatores pró-inflamatórios por meio da ativação da via de sinalização PI3K-AKT.

O papel do miR-22 também foi investigado na doença de Huntington, doença neurodegenerativa hereditária causada por uma amplificação anormal de repetições CAG no gene Huntingtina (Htt) que resulta na disfunção e perda progressiva, sobretudo, de neurônios corticais e estriatais (Johnson *et al.*, 2008; Kotowska-Zimmer *et al.*, 2022). Jovicic *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da superexpressão do miR-22 em modelos *in vitro* de doença de Huntington. Para isso, foram realizadas culturas de neurônios primários estriatais e/ou

corticais infectados com vetores de lentivírus contendo fragmento mutante do gene Htt ou tratados com ácido 3-nitropropionico (neurotoxina que mimetiza a doença). No estudo foi observado que o miR-22, ao ser superexpresso, apresenta efeitos neuroprotetores, ao aumentar a sobrevivência neuronal, e anti-apoptóticos ao reduzir a ativação de caspases efetoras, possivelmente devido à regulação de genes diretamente associados à doença, como REST correpressor 1 (Rcor1), histona desacetilase 4 (HDAC4) e regulador da sinalização da proteína G2 (Rgs2) e de genes pró-apoptóticos, como proteína cinase 14 ativada por mitógeno (MAPK14/p38).

Apesar de poucos estudos avaliarem a relação entre o miR-22 e as lesões traumáticas, este miRNA parece apresentar papel importante no traumatismo crânio encefálico, distúrbio neurodegenerativo que acomete o encéfalo e que é causado por uma força externa, geralmente quedas, acidentes de trânsito ou violência (National Institutes of Health, 2024). Esse tipo de distúrbio é marcado por danos focais, como contusões, hematomas e hemorragias intraparenquimatosas e por danos difusos, como lesões por hipóxia e isquemia e lesões axonais multifocais (McKee e Daneshvar, 2015). Utilizando modelo celular de traumatismo crânio-encefálico, Ma *et al.* (2016) mostraram que a superexpressão do miR-22 inibe a apoptose de neurônios corticais, possivelmente via redução da atividade de caspases 3 (CASP3), de proteínas X associadas a Bcl-2 (Bax) e de PTEN e aumento da expressão de proteínas de leucemia/linfoma 2 de células B (Bcl-2) e proteínas cinase B fosforiladas (p-AKT1), sugerindo, portanto, um efeito neuroprotetor.

Já na Epilepsia, estudos têm apresentado evidências sobre a importância do miR-22 no processo epileptogênico. A Epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por convulsões recorrentes e não provocadas resultantes, por exemplo, de uma mutação genética ou de uma patologia cerebral, como infecções, tumores, acidentes vasculares e lesões traumáticas cerebrais (Goldberg e Coulter, 2013). Almeida Silva *et al.* (2020), utilizando modelo murino de status epilepticus (induzido por injeção de ácido cáínico intra-amígdala) e carregando mutação nocaute de miR-22, observaram que a ablação genética deste miRNA provoca um fenótipo epiléptico exacerbado, isto é, marcado por convulsões espontâneas mais precoces, frequentes e duradouras quando comparado ao grupo controle. Beamer *et al.* (2018) utilizando o mesmo modelo de status epilepticus (SE) citado anteriormente mostrou que a inibição do miR-22 induz a uma neurogênese aberrante no hipocampo ainda mais exacerbada do aquela provocada apenas pela indução do SE e leva ao aumento do diâmetro dos dendritos e da densidade de espinhos dendríticos, o que possivelmente pode agravar o fenótipo epiléptico.

Além disso, observou-se também que apenas a supressão do miR-22 é capaz de reduzir significativamente o crescimento e arborização de dendritos.

Dessa forma, ao observar o papel do miR-22 nos diferentes modelos e estudos apresentados, a entrega ou superexpressão deste miRNA no SNC surge como potencial estratégia terapêutica para a promoção da neuroproteção e tratamento de distúrbios neurodegenerativos e neurológicos.

1.3 Vírus adeno-associado

O vírus adeno-associado (AAV) é um vírus do gênero *Dependoparvovirus* da família *Parvoviridae*, cujo genoma é um DNA linear de fita simples (Srivastava; Lusby; Berns, 1983; Geoffroy e Salvetti, 2005). Este vírus é encontrado em diferentes espécies de vertebrados e em humanos é considerado não patogênico (Wang; Tai; Gao, 2019). Além disso, apresenta diversos sorotipos e variantes, cada sorotipo com um tropismo por um tipo celular ou tecido que será determinado pelas interações do AAV com receptores de superfície celular do hospedeiro e por processos como endocitose, importação nuclear, perda do revestimento viral e síntese de uma segunda fita de DNA. AAV1 e AAV2, por exemplo, empregados neste trabalho, são sorotipos que têm tropismo por retina e SNC em humanos (Wang *et al.*, 2024).

A transdução celular pelo AAV se inicia a partir do reconhecimento do vetor por receptores de superfície da célula alvo, como os proteoglicanos de sulfato de heparano. Ao se ligar ao receptor, o AAV é internalizado por um processo de endocitose mediada por clatrina e auxiliado pelo co-receptor integrina $\alpha\beta 5$ (Summerford; Bartlett; Samulski, 1999; Bartlett; Wilcher; Samulski, 2000). Após a internalização no endossomo, o AAV trafega pelo citoplasma a partir de uma rede de citoesqueleto. Ainda neste ambiente, o vetor viral encontra um pH levemente ácido que desencadeia tardiamente mudanças conformacionais em seu capsídeo que permitem o escape endossomal (Douar *et al.*, 2001). Ao ser liberado no citosol, o AAV pode sofrer proteólise pelo proteassoma ou ser transportado para o núcleo da célula penetrando-o através de um complexo de poros nucleares. Dessa forma, no núcleo, o AAV é desencapsulado e o genoma empacotado é liberado (Berry e Asokan, 2016). Nesta etapa, os AAVs de fita simples ainda são transcricionalmente inertes, por isso, precisam ser convertidos em DNA de fita dupla via síntese da segunda fita a partir de DNA polimerases da célula hospedeira ou por anelamento de fitas já existentes no núcleo (Wang; Tai; Gao, 2019). Finalmente, as sequências ITR do AAV podem passar por recombinações inter ou intramoleculares que levarão à circularização do genoma e estabilização como DNA

episomal, o que permitirá a sua expressão em células pós-mitóticas (Duan *et al.*, 1999) (Figura 3).

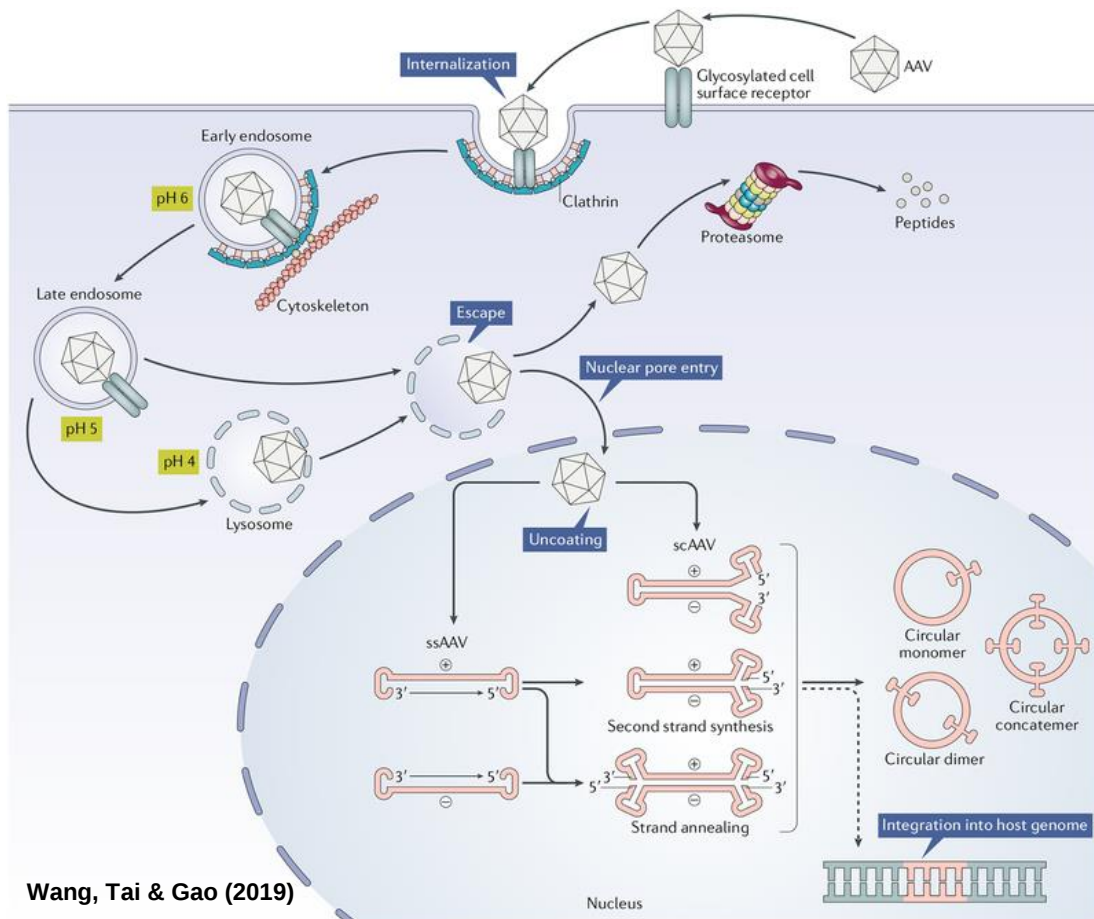


Figura 3 - Transdução celular por AAV. Para iniciar o mecanismo de transdução, o vetor de vírus adeno-associado (AAV) deve ser reconhecido por receptores de superfície da célula alvo. Dessa forma, o vetor viral é internalizado via endocitose mediada por clatrina, formando um endossomo. Auxiliado por uma rede de citoesqueleto, o AAV trafega pelo citoplasma. O pH ácido encontrado neste ambiente provoca mudanças conformacionais no AAV que permitem o seu escape do endossomo. Neste momento o AAV pode seguir por duas vias: entrar no núcleo da célula através de um complexo de poros nucleares ou permanecer no citoplasma e ser degradado pelo proteossoma. No núcleo, o AAV é desencapsulado e libera o seu genoma, DNA de fita simples (ssAAV) ou autocomplementar (scAAV). No caso do ssAAV, uma segunda fita de DNA deverá ser sintetizada utilizando a maquinaria da célula hospedeira. Finalmente, o genoma do AAV poderá passar por circularização, assumindo a forma episomal ou, menos frequentemente, poderá se integrar ao genoma do hospedeiro.

A transferência gênica mediada por AAV apresenta grande potencial para o desenvolvimento de medicamentos de terapia gênica que podem se basear, principalmente, em três estratégias: substituição de um gene disfuncional por uma cópia saudável; inserção, deleção ou alteração de uma sequência alvo no DNA, por técnica de CRISPR, por exemplo; e silenciamento gênico a partir da inibição da expressão de um gene causador de doença (Gao *et al.*, 2024).

A partir do AAV é possível construir um vetor de AAV recombinante (rAAV) para expressar um transgene de interesse em uma célula ou tecido alvo. Para isso, os genes de replicação (Rep) e que dão origem às proteínas do capsídeo viral (Cap) podem ser substituídos por um promotor e um gene terapêutico, enquanto as sequências ITR devem permanecer para a replicação e empacotamento do genoma no capsídeo (Grieger e Samulski, 2012). Os vetores de rAAV apresentam características que lhes conferem vantagens em relação aos demais vetores virais. Os rAAVs são pequenos, dificilmente se integram ao genoma do hospedeiro, apresentam amplo tropismo, baixa imunogenicidade e patogenicidade, uma vez que não possuem sequências virais e são capazes de sustentar a expressão do transgene a longo prazo em tecidos não mitóticos (Thomas; Ehrhardt; Kay, 2003; Qu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2024).

Os vetores de rAAV têm sido amplamente utilizados em estudos clínicos para o tratamento de doenças degenerativas e já são empregados em terapias gênicas. Em 2017, o *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou a primeira terapia para Distrofia Retiniana associada à mutação bialélica do gene codificador da proteína específica do epitélio pigmentar da retina 65 (RPE65) que leva à perda progressiva de visão durante a infância e adolescência, podendo levar à cegueira. Para o desenvolvimento desta terapia, denominada Voretigene neparvovec ou Luxturna, foi utilizado um vetor de rAAV para entregar uma cópia normal do gene mutado para células da retina. Neste caso, foi empregado o vetor de rAAV sorotipo 2 (rAAV2) capaz de transduzir, sobretudo, células do epitélio pigmentar da retina (FDA, 2017; Gao; Hussain; Weng, 2020).

Em 2019, uma nova terapia que também utiliza o vetor de rAAV como ferramenta de entrega foi aprovada pelo FDA, o Onasemnogene abeparvovec, conhecido como Zolgensma. Esse medicamento foi produzido para o tratamento da Atrofia Muscular Espinhal, uma doença autossômica recessiva causada por mutação, deleção ou rearranjo no gene do neurônio motor de sobrevivência 1 (SMN1), resultando na degeneração de neurônios motores (Govoni *et al.*, 2018). O Zolgensma consiste em uma terapia de dose única que utiliza o vetor rAAV9, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, para entregar uma cópia funcional do gene SMN1 (Ogbonmide *et al.*, 2023).

Os vetores de rAAV apresentam grande potencial na entrega de genes em tecidos que compõem o SNC. A construção destes vetores virais associada à integração de sequências de miRNA constitui, portanto, uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de terapias

gênicas para condições que exijam, em algum nível, a modulação genética, como é o caso de diversos distúrbios neurodegenerativos.

2. Justificativa

Os distúrbios neurodegenerativos têm se tornado uma emergência global, impactando a saúde pública e os setores econômicos e sociais (Wang S. *et al.*, 2024). Em 2021 entre as vinte condições responsáveis pelos maiores DALYs (do inglês *Disability-adjusted life year*) no sistema nervoso estavam a doença de Alzheimer e outras demências, doença de Parkinson, lesão crânio-encefálica e lesão da medula espinhal (Steinmetz *et al.*, 2024). Além disso, no mesmo ano, a doença de Alzheimer e outras formas de demência foram classificadas como a sétima principal causa de morte no mundo (WHO, 2024). Atualmente não existe cura para os distúrbios neurodegenerativos e os tratamentos disponíveis se baseiam na amenização dos sintomas, desaceleração do processo degenerativo e melhora da qualidade de vida do indivíduo (Fan *et al.*, 2022; Shusharina *et al.*, 2023; Tian; Zhang; Yang, 2023; Carroll *et al.*, 2024). Como o dano axonal é um evento precoce no curso de diferentes distúrbios neurodegenerativos, é importante estudar estratégias que permitam não só retardar a progressão destes distúrbios, como também promover a regeneração axonal e, consequentemente, a recuperação de funções neurológicas perdidas.

Como mostrado na seção anterior, os miRNAs apresentam importantes funções no SNC. Em modelos de distúrbios neurodegenerativos, a expressão aumentada do miR-22, foco deste trabalho, apresenta efeitos neuroprotetores e anti-apoptóticos. Contudo, até o momento, ainda não há na literatura estudos que abordem a função deste miRNA na degeneração e regeneração de axônios no SNC, processos essenciais para a recuperação funcional de neurônios afetados nestes distúrbios. Dessa forma, investigar o papel do miR-22 no contexto de lesão neuronal e adotar métodos que viabilizem sua superexpressão em áreas do SNC torna-se necessária. A entrega de genes de interesse em tecidos e células específicos por vetores de rAAV é uma técnica eficiente para o tratamento de diferentes doenças, como tem sido mostrado por medicamentos baseados em terapia gênica. Ao considerarmos as vantagens oferecidas por essa técnica e os efeitos já observados pela expressão do miR-22, avaliamos neste estudo os efeitos da superexpressão do miR-22, mediada por rAAV (rAAV.miR-22), na degeneração e regeneração axonal *in vitro*. Dessa forma, hipotetizamos que o rAAV.miR-22 é capaz de promover efeitos pró-regenerativos após lesão no SNC a partir da modulação de vias intrínsecas.

3. Objetivos

3.1 Geral

Testar os efeitos do rAAV.miR-22 na regeneração e degeneração de neurônios do SNC a partir de modelos *in vitro*.

3.2 Específicos

2.2.1 Avaliar, a partir de modelos *in vitro* de cultura primária de neurônios corticais se a superexpressão do miR-22, utilizando vetores de rAAV, é capaz de:

- a) influenciar o crescimento neurítico,
- b) modular a arborização neurítica,
- c) promover regeneração de neuritos,
- d) induzir regeneração axonal,
- e) atenuar a degeneração axonal.

2.2.2 Analisar os possíveis mecanismos pelos quais o miR-22 age e identificar seus genes alvos.

4. Métodos

4.1 Produção dos vetores virais

Vetores de rAAV utilizados para a transdução de células neuronais e superexpressão do miR-22 foram produzidos e testados em colaboração com o Prof. Uwe Michel da Universidade de Medicina de Göttingen, Alemanha.

Para a produção dos rAAVs foram utilizados o promotor Sinapsina humana (hSyn) específico para neurônios para expressão de mCherry, uma proteína fluorescente que permite a identificação de células transduzidas, e o promotor H1 específico para RNAs não codificantes para promover a superexpressão do miR-22. O vetor expressando o miRNA (rAAV.miR-22) contém a sequência tanto do miR-22 quanto da proteína mCherry, já o vetor controle expressa apenas a proteína mCherry (rAAV.CTRL). O rAAV utilizado neste trabalho tem um capsídeo híbrido contendo proteínas dos sorotipos 1 (AAV1) e 2 (AAV2), sendo que uma proteína do sorotipo 2 possui substituições em 4 resíduos de aminoácidos (AAV2mut), que reduz a degradação via proteassoma (Zhong *et al.*, 2008).

A produção dos rAAVs (sorotipo 1/2 mut) foi realizada a partir de uma transfecção quádrupla de células de rim imortalizadas (HEK-293) utilizando o plasmídeo de expressão (contendo os transgenes), um plasmídeo helper (pHelper), um plasmídeo pACG-2, e um plasmídeo pH 21, que contém os genes rep e cap, responsáveis por codificar proteínas de replicação e proteínas estruturais do capsídeo viral, respectivamente. Após a transfecção, as células passaram por sucessivas etapas de congelamento e descongelamento para lise celular e o rAAV foi, então, purificado por ultracentrifugação em um gradiente de iodixanol para a separação dos componentes lisados do vetor produzido. Posteriormente, foi realizada cromatografia líquida em coluna de heparina, seguida de diálise, a fim de se obter um maior grau de pureza na produção. Desse modo, os vetores foram produzidos em larga escala e com elevados títulos: $2,5 \times 10^8$ partículas virais/ μL (rAAV.miR-22) e $5,2 \times 10^7$ partículas virais/ μL (rAAV.CTRL) (Figura 4).

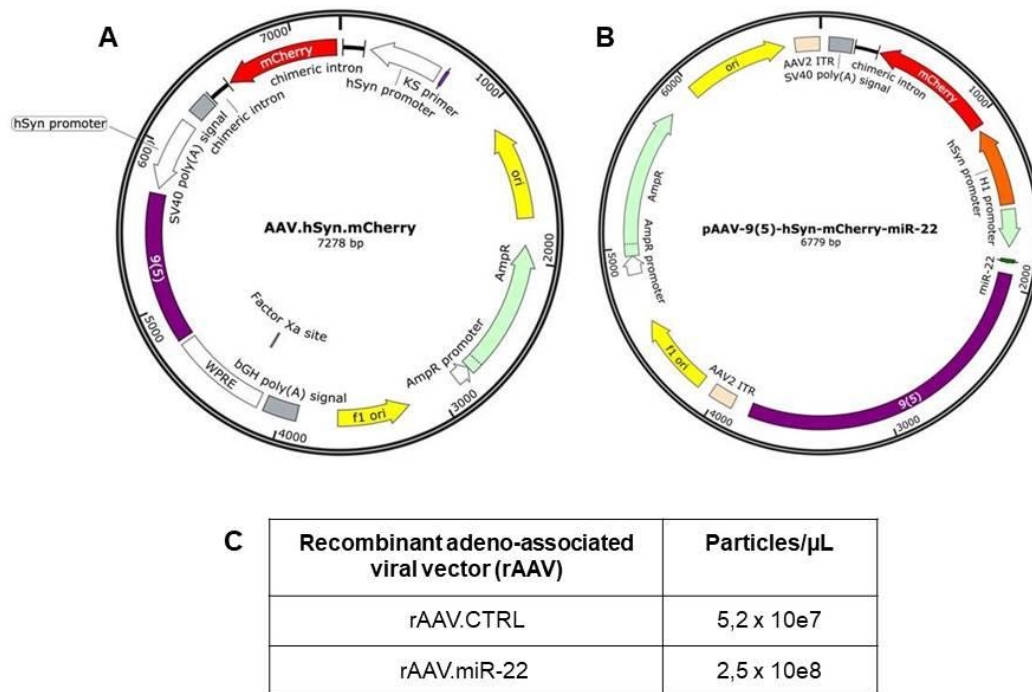


Figura 4 - Mapa e titulação dos vetores virais. Plasmídeos usados para a produção dos vetores de rAAV. **A)** Vetor controle expressando apenas a proteína fluorescente mCherry (rAAV.CTRL) **B)** Vetor expressando miR-22 e mCherry (rAAV.miR-22). **C)** Concentrações do rAAV.CTRL e do rAAV-miR-22.

4.2 Cultura de neurônios corticais primários

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em um modelo de cultura de neurônios corticais primários. Anteriormente ao preparo da cultura celular, placas de cultivo celular de 24 ou 96 poços foram preparadas para receber as células neuronais. A cada um dos

poços foram adicionadas lamínulas esterilizadas e estas foram revestidas com Poli-L-Ornitina (PLO - 10 µg/mL) por quatro horas, a fim de promover melhor adesão e fixação das células à superfície, e mantidas em cabine de fluxo laminar. Posteriormente, os poços foram lavados com água ultrapura estéril e as lamínulas foram cobertas por solução de Laminina (1 µg/mL), proteína da matriz extracelular também utilizada para facilitar a adesão. A placa de cultura foi então armazenada em incubadora de CO₂ a 37°C por um período de 12 a 16 horas (*overnight*). No dia seguinte, os poços foram novamente lavados com tampão fisiológico salino (PBS) estéril e, aos mesmos, foi adicionado meio de cultura, composto por 95% Neurobasal, 2% B27, 1% Glutamax, 1% PSN (Penicilina-Estreptomicina-Neomicina) e 1% Transferrina.

Para a realização das culturas foram utilizados embriões com 18 dias embrionários (E18) de ratos Wistar. As fêmeas prenhas foram eutanasiadas em câmara de CO₂ de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 237/2018 – Anexo A). De cada um dos embriões foram retirados os córtices cerebrais e removidas as meninges. Os córtices já cortados em pedaços menores foram transferidos para um tubo Falcon contendo PBS e este foi centrifugado por 4 min, a 4°C e 800 rpm. O pellet obtido foi ressuspensionado em tripsina 0,25%, para dissociação da matriz extracelular, e mantido em banho maria a 37°C por 10 min. Para degradar fragmentos de DNA gerados no processo e auxiliar a dissociação das células, foi adicionada DNase (5 mg/mL) e a solução foi centrifugada novamente por 2 min. Já para inativar a tripsina a solução final foi ressuspensionada em soro fetal bovino. Por fim, as células passaram por dissociação mecânica, utilizando pipetas Pasteur previamente preparadas com diferentes calibres, a solução foi centrifugada novamente por 2 min, o soro sobrenadante foi retirado e as células ressuspensionadas em meio de cultura completo como descrito acima.

Para contagem das células e posterior plaqueamento foi preparada uma solução celular com azul de Tripán. Desta solução foram adicionados 10 µL em uma Câmara de Neubauer e, utilizando microscópio óptico (aumento 10x), foi quantificado o número de células presentes em cada um dos quadrantes da câmara. Em seguida, foi feita uma média dos números obtidos e o valor final foi multiplicado pelo fator de correção da câmara de Neubauer (10⁴) e pelo fator de diluição utilizado nos experimentos (10¹). Dessa forma, as células foram plaqueadas em diferentes densidades, de acordo com os objetivos de cada experimento.

4.3 Eficiência de transdução dos vetores de rAAV

A eficiência de transdução dos vetores virais produzidos foi avaliada a partir das culturas de neurônios corticais primários (E18). Quatro horas após o plaqueamento das células

neurônais em placa de 24 poços (250.000 células/poço), foram adicionados aos poços da placa de cultura os vetores rAAV CTRL e rAAV.miR-22 nas concentrações 1×10^5 , 5×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 partículas virais/poço. No oitavo dia *in vitro* (DIV8) essas células foram fixadas utilizando paraformaldeído 4% (PFA) e, posteriormente, fotografadas utilizando o microscópio Axio Imager com módulo Apotome (Zeiss) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI - UFMG) com microscopia de contraste de fase e de fluorescência. A partir das imagens obtidas e utilizando a ferramenta “Cell counter” do software ImageJ, foi feita uma análise comparativa por meio da contagem do número de células transduzidas, isto é, marcadas pela proteína fluorescente mCherry e o número total de células contadas pela microscopia de contraste de fase.

4.4 Teste de viabilidade celular

Como o objetivo de avaliar a viabilidade de células neuronais após a transdução com os vetores rAAV CTRL e rAAV.miR-22 foi realizado um ensaio de MTT. Este ensaio colorimétrico consiste, basicamente, na redução do sal MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em cristais de formazan por mitocôndrias de células metabolicamente ativas, atuando, portanto, como um indicador de citotoxicidade (Ying; Gottron; Choi, 2000). Este experimento foi conduzido em colaboração com a Pós-doutoranda Júlia Nogueira e Prof. Érika Jorge da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para isso, neurônios corticais primários (E18) foram plaqueados em placas de 96 poços com uma densidade de 40.000 células/poço. Após 4 horas foram adicionados os vetores rAAV CTRL ($1 \cdot 10^7$ partículas virais/poço) e rAAV.miR-22 ($5 \cdot 10^6$ partículas virais/poço) e dois poços foram utilizados como controle negativo, isto é, não receberam os vetores virais. No DIV7 foi realizado ensaio de MTT, para isso, foi retirado o meio de cultura de cada um dos poços, adicionado MTT diluído em meio (1:10) e a placa de cultura foi incubada em estufa por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o MTT foi retirado, os poços lavados com PBS e 500 µl de isopropanol ácido foram adicionados aos poços para a ressuspensão e diluição dos cristais de formazan, por 5 minutos no agitador. Em seguida, 100 µl de solução de cada um dos grupos (rAAV CTRL, rAAV.miR-22 e controle negativo) foram transferidos em triplicatas para uma nova placa de 96 poços. Finalmente, utilizando um espectrofotômetro foi medido o valor de absorbância da solução obtida (faixa de 595 nm). Para a leitura dos dados considerou-se que quanto mais clara ou escura a cor resultante, menor ou maior, respectivamente, o número de células metabolicamente viáveis.

4.5 Imunofluorescência

Para a avaliação do crescimento e arborização de neuritos foi utilizado protocolo de imunofluorescência. Ao final dos experimentos as células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos e, em seguida, lavadas com PBS. Para a permeabilização foi adicionada aos poços solução de 0,5% Triton X-100 em PBS por 20 minutos e, posteriormente, adicionou-se solução de bloqueio (1% albumina sérica bovina e 5% soro de cabra diluídos em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram então incubadas com anticorpo primário anti- β -III-tubulina (Tuj-1), marcador de microtúbulos presentes nos neuritos e corpos celulares neuronais, diluído em solução de bloqueio (1:10.000) overnight a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, os poços foram lavados três vezes com PBS por aproximadamente 5 minutos e as células incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 diluído em solução de bloqueio (1:1000). Finalmente, os poços foram novamente lavados com PBS, as lamínulas foram retiradas da placa de cultura, montadas em lâminas 24 x 50 mm utilizando Fluoromount e armazenadas a 4°C para posterior análise em microscópio de fluorescência.

4.6 Crescimento de neuritos *in vitro*

Com o objetivo de avaliar o crescimento de neuritos *in vitro*, neurônios corticais embrionários foram plaqueados em placas de 24 poços (40.000 células/poço) e quatro horas depois transduzidos com os vetores rAAV CTRL ou rAAV.miR-22 (1.10^7 partículas virais/poço). No DIV8, as células foram fixadas com PFA 4% e, posteriormente, foi realizada imunofluorescência com o anticorpo Tuj1. Imagens da imunofluorescência de Tuj1 nas células neuronais foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência Axio Imager com módulo Apotome (Zeiss) do CAPI - UFMG. O crescimento de neuritos foi analisado a partir do programa ImageJ e plugin NeuronJ, o qual forneceu a área marcada pelo anticorpo Tuj-1 em cada imagem, posteriormente normalizada pelo número de corpos celulares presentes no mesmo campo observado, para evitar viés de número de células. Neste experimento para cada grupo (rAAV CTRL e rAAV.miR-22) foram analisadas cinco imagens de diferentes poços para cada uma das culturas realizadas.

4.7 Análise da arborização de neuritos *in vitro*

Para avaliar a complexidade da arborização neurítica, foi realizada cultura primária de neurônios corticais em baixa densidade (20.000 células/poço). Após quatro horas estas células foram transduzidas com os vetores rAAV CTRL ou rAAV.miR-22 (1.10^7 partículas

virais/poço), fixadas no DIV8 com PFA 4% e realizada imunofluorescência com o anticorpo Tuj1. Para as análises foram feitas dez imagens de diferentes campos de cada uma das culturas para ambos os grupos experimentais (rAAV.miR-22 e AAV.CTRL). Imagens da imunofluorescência de Tuj1 nas células neuronais foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência Axio Imager com módulo Apotome (Zeiss) do CAPI - UFMG. Desse modo, as células neuronais foram analisadas individualmente utilizando o método de Sholl. Nesta análise, com o auxílio do software Fiji/ImageJ e plugin Neuroanatomy, foi marcado um ponto no centro do corpo celular do neurônio, a partir do qual foram estabelecidos círculos concêntricos com distâncias de 5 μm entre si, atingindo um raio final de 80 μm . Desse modo, foi quantificado o número de interseções entre os neuritos e cada um dos raios estabelecidos.

4.8 Regeneração de neuritos após lesão do tipo *scratch in vitro*

Para avaliar a regeneração de neuritos (axônios e dendritos), após a transdução das células neuronais (150.000 células/poço) com os vetores rAAV.CTRL ou rAAV.miR-22 (1.10^7 partículas virais/poço), no DIV7 foi feita uma lesão do tipo “scratch” em cada um dos poços da placa de cultura utilizando uma ponteira de 200 μl . Após 24h, as células foram fixadas com PFA4% e as lamínulas dispostas em lâminas histológicas. Imagens da fluorescência de mCherry nas células neuronais na região da lesão e anterior à lesão foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência Axio Imager com módulo Apotome (Zeiss) do CAPI - UFMG. Para cada um dos experimentos (culturas neuronais) realizados, foram obtidas quatro fotos por grupo experimental.

Para a análise das imagens, primeiramente foi traçada uma linha determinando a borda da lesão, a partir da qual foram estabelecidas as distâncias de 100 μm e 200 μm . Dessa forma, foram quantificados o comprimento total de neuritos na área entre 100 μm e 200 μm posterior à lesão com o auxílio do software Fiji/ImageJ e plugin NeuronJ e também o número de neuritos que cruzavam a distância de 200 μm . Os valores obtidos foram normalizados pelo número de corpos celulares presentes na área de 100 μm anterior à borda da lesão, para evitar viés de número de células.

4.9 Cultura neuronal em câmara microfluídica

Com o objetivo de avaliar exclusivamente a regeneração e degeneração axonal, foi adotado um modelo de cultura primária de neurônios corticais em câmaras microfluídicas, o

qual permite separar os axônios das células neuronais de seus corpos celulares e dendritos (Vahsen et al., 2020; Ribas et al., 2021) (Figura 5). Para este experimento foram construídas câmaras microfluídicas usando silicone PDMS (Sylgard 184, Dow Corning). Estas foram lavadas com jato de água, imersas em um béquer contendo água destilada deixado em banho maria a 37,5°C *overnight*, secadas em fluxo laminar, foram limpas utilizando fita adesiva e, por fim, esterilizadas com álcool 70%. Posteriormente, as câmaras microfluídicas foram acopladas em lamínulas 24 x 60 mm previamente limpas e esterilizadas, e armazenadas em placas de Petri. Após o acoplamento, foi iniciado o protocolo de revestimento das lamínulas. Primeiramente, foi adicionada água ultrapurificada e estéril a cada um dos poços das câmaras microfluídicas, estas foram armazenadas em incubadora de CO₂ a 37°C por aproximadamente 30 minutos até que a água atravessasse completamente os microcanais. Em seguida, a água foi retirada de todos os poços, e adicionou-se poli-L-lisina (PLL; 0.1 mg/mL), usada para promover adesão celular ao substrato. As câmaras foram então novamente armazenadas em incubadora de CO₂ *overnight*. No dia seguinte, a PLL foi retirada e três lavagens de 30 minutos com água ultrapurificada foram realizadas, seguidas de duas lavagens com meio de cultura. No mesmo dia (DIV0), 2 µl de solução contendo células neuronais corticais foram adicionados a um dos canais (compartimento somático) das câmaras microfluídicas (30.000 células/câmara na análise de regeneração axonal ou 10.000 células/câmara na análise de degeneração axonal). No dia seguinte, foi realizada a transdução celular utilizando os vetores rAAV CTRL e rAAV.miR-22 (1.10⁷ partículas virais/poço).

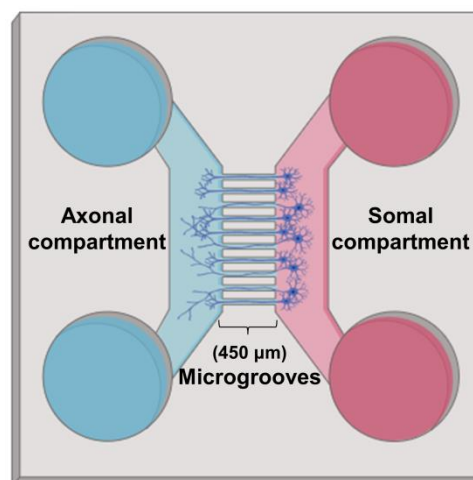


Figura 5 - Câmara microfluídica. Desenho esquemático de uma câmara microfluídica mostrando o compartimento somático (somal compartment) onde as células são plaqueadas, microcanais (microgrooves) com 450 µm de comprimento e compartimento axonal (axonal compartment) para o qual se estendem apenas prolongamentos axonais.

4.10 Análise de regeneração e degeneração axonal por imageamento em tempo real de neurônios corticais plaqueados em câmara microfluídica

Para a análise de regeneração axonal, os axônios localizados no compartimento axonal foram lesionados por sucção utilizando uma bomba a vácuo no DIV7. Utilizando o microscópio de fluorescência Axio Vert (Zeiss) foram feitas imagens dos neurônios vivos expressando a proteína fluorescente mCherry com objetiva de 20x do compartimento axonal, dos microcanais e do compartimento somático antes da lesão, imediatamente após a lesão e 48h após a lesão. Para a análise das imagens obtidas foram selecionados 10 canais de cada câmara microfluídica. A análise quantitativa foi expressa pelo número de axônios que ultrapassavam as distâncias de 200 μm , 400 μm e 600 μm em relação à borda da lesão no tempo de 48h após a lesão. Para evitar viés os valores foram divididos pelo número de axônios antes da lesão (Ribas *et al.*, 2021).

Já para os experimentos de degeneração axonal a lesão foi realizada no DIV10 e foram feitas imagens dos neurônios vivos expressando a proteína fluorescente mCherry com objetiva de 40x no compartimento axonal e nos microcanais anteriormente à lesão, imediatamente após a lesão, duas horas, quatro horas e seis horas após a lesão utilizando o microscópio de fluorescência Axio Vert (Zeiss). As análises foram realizadas a partir da seleção de 10 prolongamentos axonais em cada câmara microfluídica. A análise quantitativa foi expressa pelo número de inchaços axonais (com diâmetro maior ou igual a 2 μm) nos 200 μm proximais em relação ao local da lesão (final do microcanal) em todos os tempos após a lesão diminuindo dos inchaços presentes nos axônios antes da lesão (Vahsen *et al.*, 2020).

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 9. Para as análises de regeneração de neuritos os valores foram normalizados pelo controle (100%) e foi usado o teste t de uma amostra (*one sample t-test*). Nos experimentos de viabilidade celular, crescimento de neuritos e regeneração de axônios (para cada distância e tempo) foi usado o teste t não pareado (*two-tailed unpaired t-test*). Nos experimentos de complexidade da arborização neurítica e degeneração axonal foi utilizado o teste *two-way* ANOVA e pós teste de Sidak para comparações múltiplas. Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média. Os valores foram considerados significativos para um $P < 0,05$.

4.12 Análises de bioinformática

Análises *in silico* foram realizadas a fim de se investigar os possíveis mecanismos pelos quais o miR-22 atua e identificar seus RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Para isso, foram utilizadas as plataformas miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), que forneceu os alvos preditos e validados do miR-22, e a WebGestalt (WEB-based Gene SeT Analysis Toolkit - <https://www.webgestalt.org/>), que permitiu a realização de análises de enriquecimento funcional para os alvos, considerando características como processos biológicos aos quais estão associados, funções moleculares e componentes celulares. Na interface miRWalk as análises basearam-se na sequência hsa-miR-22-3p, sequência de 22 nucleotídeos encontrada em *Homo sapiens*, e correspondente à fita madura (3p) do miR-22. Para os alvos preditos foi adotado um score de 0.8 e selecionado o banco de dados TargetScan, enquanto para os alvos validados também foi adotado um score de 0.8 e selecionado os bancos de dados TargetScan e miRTarBase.

Na plataforma WebGestalt, utilizada para as análises funcionais dos alvos preditos, foram selecionados alguns parâmetros básicos: “Over-Representation Analysis” (ORA) como método de interesse e “Gene Ontology” como banco de dados funcional. Para os parâmetros avançados foram selecionados: cinco alvos como número mínimo e dois mil como número máximo de genes por categoria, Benjamini–Hochberg (BH) como método de ajuste de teste múltiplo, e False Discovery Rate (FDR) para o controle de falsos positivos, com limite de significância correspondente a 0.10.

Em relação aos alvos validados, para cada um dos genes listados foram feitas buscas na plataforma PubMed relacionadas aos termos em inglês: central nervous system, neurodegeneration, neuroprotection, axonal regeneration, axonal degeneration, neuronal survival, synapse, Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease, Glaucoma e optic nerve.

5. Resultados

5.1 rAAV.miR-22 transduz eficientemente neurônios corticais primários *in vitro* sem promover citotoxicidade em comparação com rAAV.CTRL

Para avaliar o papel do miR-22 na degeneração e regeneração de neurônios do SNC vetores de rAAV expressando o miR-22 (rAAV.miR-22) em conjunto com a proteína fluorescente mCherry foram produzidos. Como controle foi usado um vetor de rAAV expressando apenas a proteína fluorescente mCherry (rAAV.CTRL) (Figura 6A). Primeiramente foi testado se ambos os vetores eram capazes de transduzir eficientemente neurônios corticais primários *in vitro*. Para isso, a cultura de neurônios corticais primários foi preparada, 4 h após os neurônios foram transduzidos com os vetores rAAV.miR-22 ou rAAV.CTRL e no DIV8 foi avaliada a eficiência de transdução de ambos os vetores de rAAV (Figura 6B).

Foi observado, a partir de imagens obtidas por microscopia de fluorescência e de contraste de fase, que a titulação de melhor eficiência de transdução foi de 1×10^7 partículas virais/poço, com uma taxa de 80-90% das células neuronais transduzidas tanto no grupo controle (rAAV.CTRL) quanto no grupo em que o miR-22 foi superexpresso (rAAV.miR-22) (Figura 6C). Para avaliar a viabilidade celular após as células serem transduzidas com os vetores de rAAV, foi realizado no DIV7 o ensaio colorimétrico de MTT. Os resultados revelaram que ao comparar os grupos transduzidos com os vetores rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 6D). Esses dados sugerem que ambos os vetores são capazes de transduzir eficientemente neurônios corticais primários sem causar citotoxicidade diferencial entre eles.

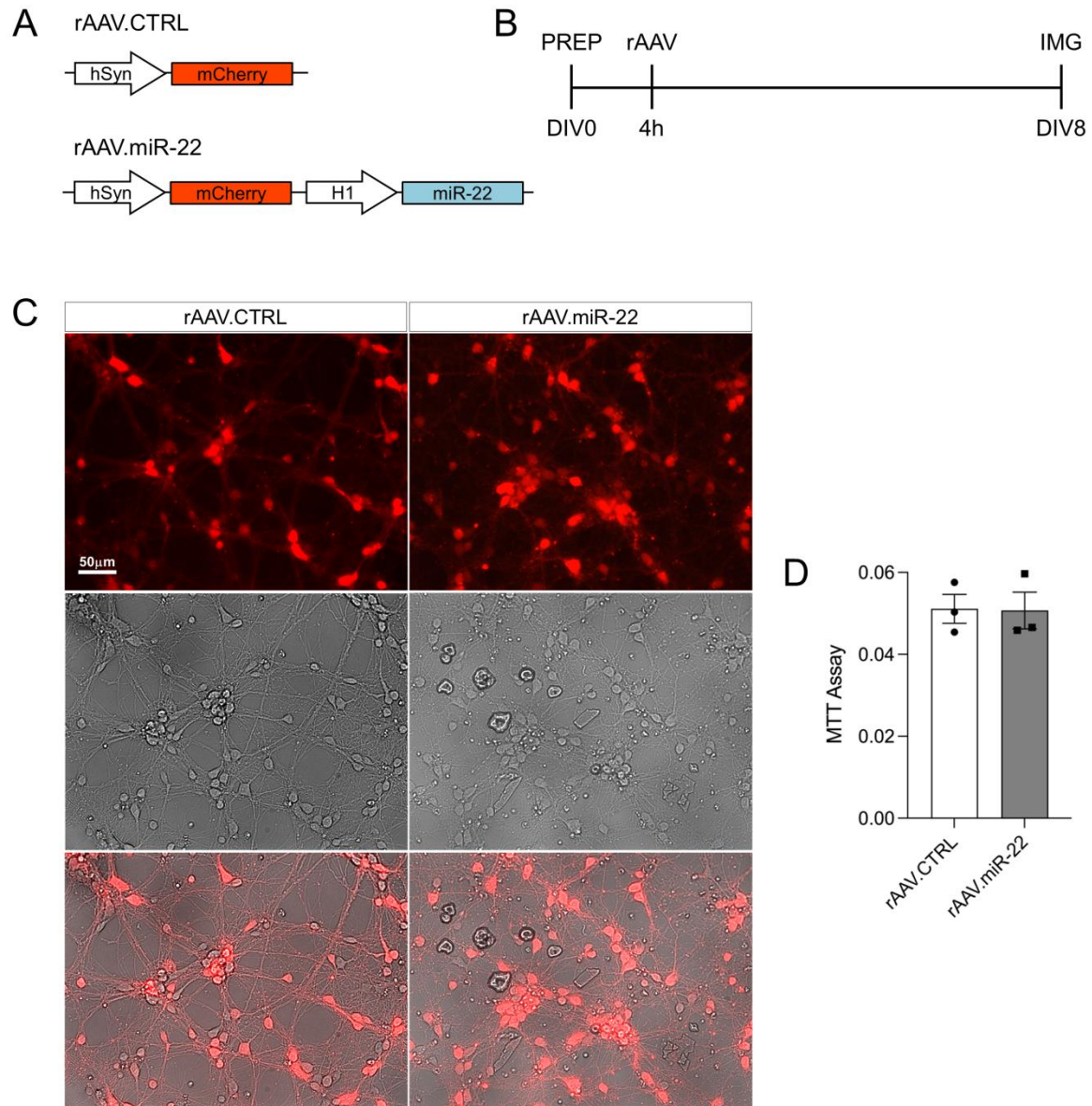


Figura 6 - Transdução de neurônios corticais primários utilizando rAAV.CTRL e rAAV.miR-22. **A)** Mapas dos vetores rAAV controle (rAAV.CTRL) e do rAAV para superexpressão do miR-22 (rAAV.miR-22), ambos expressando a proteína fluorescente mCherry sob o controle do promotor sinapsina humana (hSyn). A expressão do miR-22 está sob controle do promotor H1. **B)** Desenho experimental para o teste de transdução dos vetores virais. PREP: realização da cultura de neurônios corticais primários. DIV: dia *in vitro*. rAAV: transdução com os vetores virais. IMG: obtenção de imagens de microscopia. **C)** Imagens obtidas 8 dias após transdução dos neurônios corticais mostrando, respectivamente, expressão da proteína mCherry (vermelho), contraste de fase e sobreposição das imagens. Barra de escala: 50 μ m. **D)** Quantificação da viabilidade celular por ensaio de MTT (n = 3 culturas independentes). Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística foi realizada através do teste t não pareado (P = 0.9465).

5.2 rAAV.miR-22 não tem efeito no crescimento e arborização de neuritos

Para avaliar se o rAAV.miR-22 influencia o crescimento de neuritos foram realizadas culturas de neurônios corticais primários, os quais 4 h depois foram transduzidos com os vetores de rAAV. Para a posterior identificação de corpos celulares e neuritos, foi realizada imunofluorescência para β -III-tubulina (Tuj-1), em seguida, foi feito imageamento utilizando microscópio de fluorescência (Figuras 7A-B). Neste experimento as análises basearam-se na quantificação da área marcada por Tuj-1 normalizada pelo número de células neuronais presentes na imagem. A partir dos resultados obtidos, foi observado que não houve diferença significativa na área da marcação de Tuj1 ao comparar os grupos rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 (Figuras 7C-D), sugerindo que o rAAV.miR-22 não influencia o crescimento de neuritos nesse modelo.

A fim de averiguar se o rAAV.miR-22 exerceria algum efeito na arborização dos neuritos foi utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente para cultura neuronal e imunofluorescência (Figuras 8A). Contudo, para este experimento foi utilizada uma menor densidade celular para a obtenção de neurônios isolados (Figuras 8B). As observações basearam-se na realização de análises de Sholl, a partir das quais foi quantificado o número de interseções entre os neuritos e os raios estabelecidos (Figura 8C). Através da análise de comparações múltiplas (Sidak) não foi vista diferença estatisticamente significativa no número de interseções entre os neuritos e os raios em nenhum dos raios traçados, comparando os grupos rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 (Figura 8D). A análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) indica que há diferença estatisticamente significativa entre as curvas rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 ($P=0.0098$), no entanto, não foi possível determinar em qual(is) raio(s) houve essa diferença (Figura 8D). Dessa forma, os resultados indicam que o rAAV.miR-22 parece não influenciar de maneira significativa a arborização de neuritos.

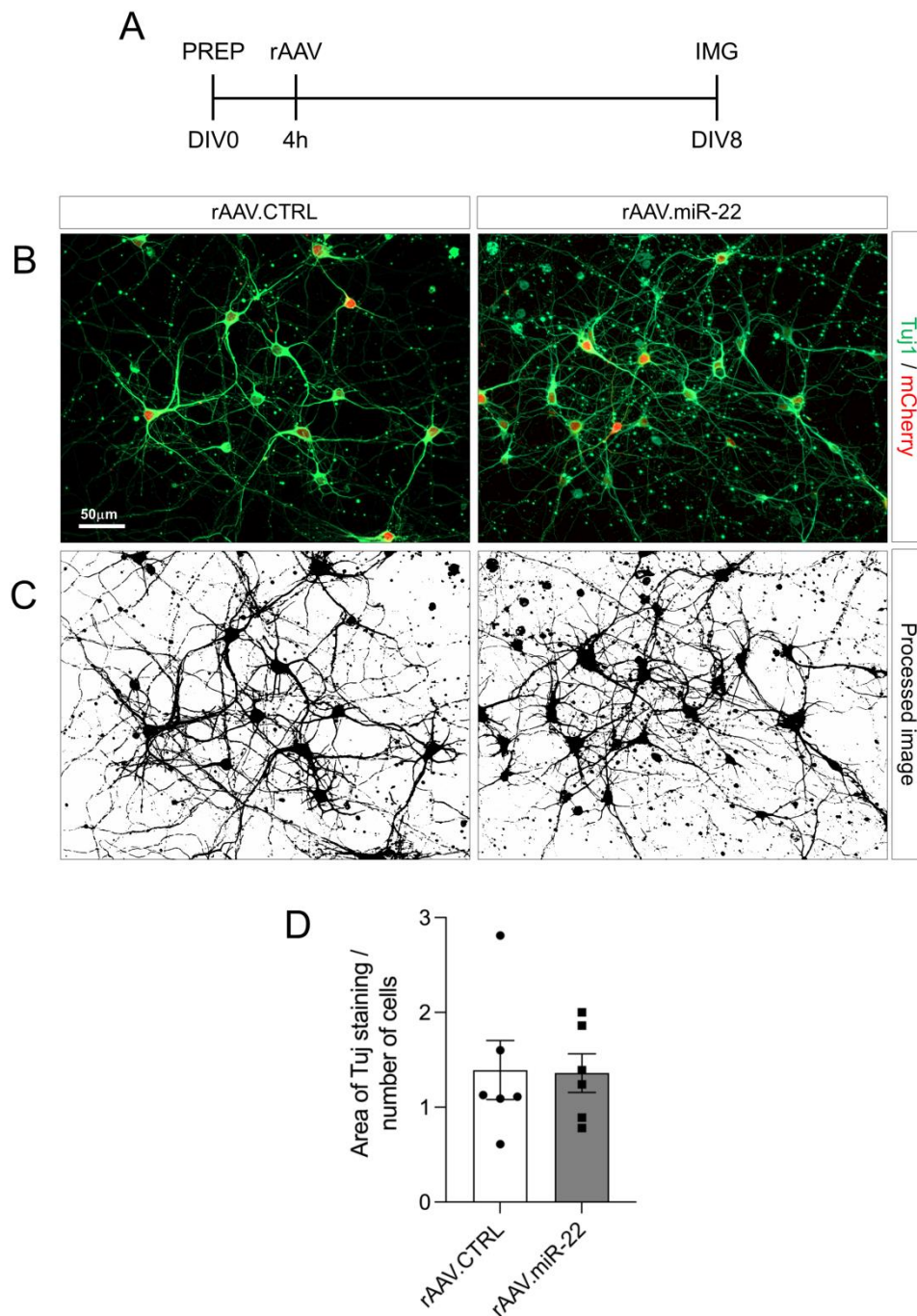


Figura 7 - Efeito do rAAV.miR-22 no crescimento de neuritos. **A)** Desenho experimental para o ensaio de crescimento de neuritos. PREP: realização da cultura de neurônios corticais primários. DIV: dia *in vitro*. rAAV: transdução com os vetores virais. IMG: obtenção de imagens de microscopia. **B)** Imagens obtidas no DIV8 por microscopia de fluorescência de neurônios transduzidos por rAAV CTRL e rAAV.miR-22 expressando mCherry (vermelho) e o marcador de β -III-tubulina Tuj-1 (verde). **C)** Imagens mostradas em B após processamento no software ImageJ para quantificação área da marcação de Tuj1. Barra de escala: 50 μ m. **D)** Quantificação da área marcada por Tuj-1 normalizada pelo número de corpos celulares (n = 6). Análise estatística de acordo com teste t não pareado (P = 0.3683).

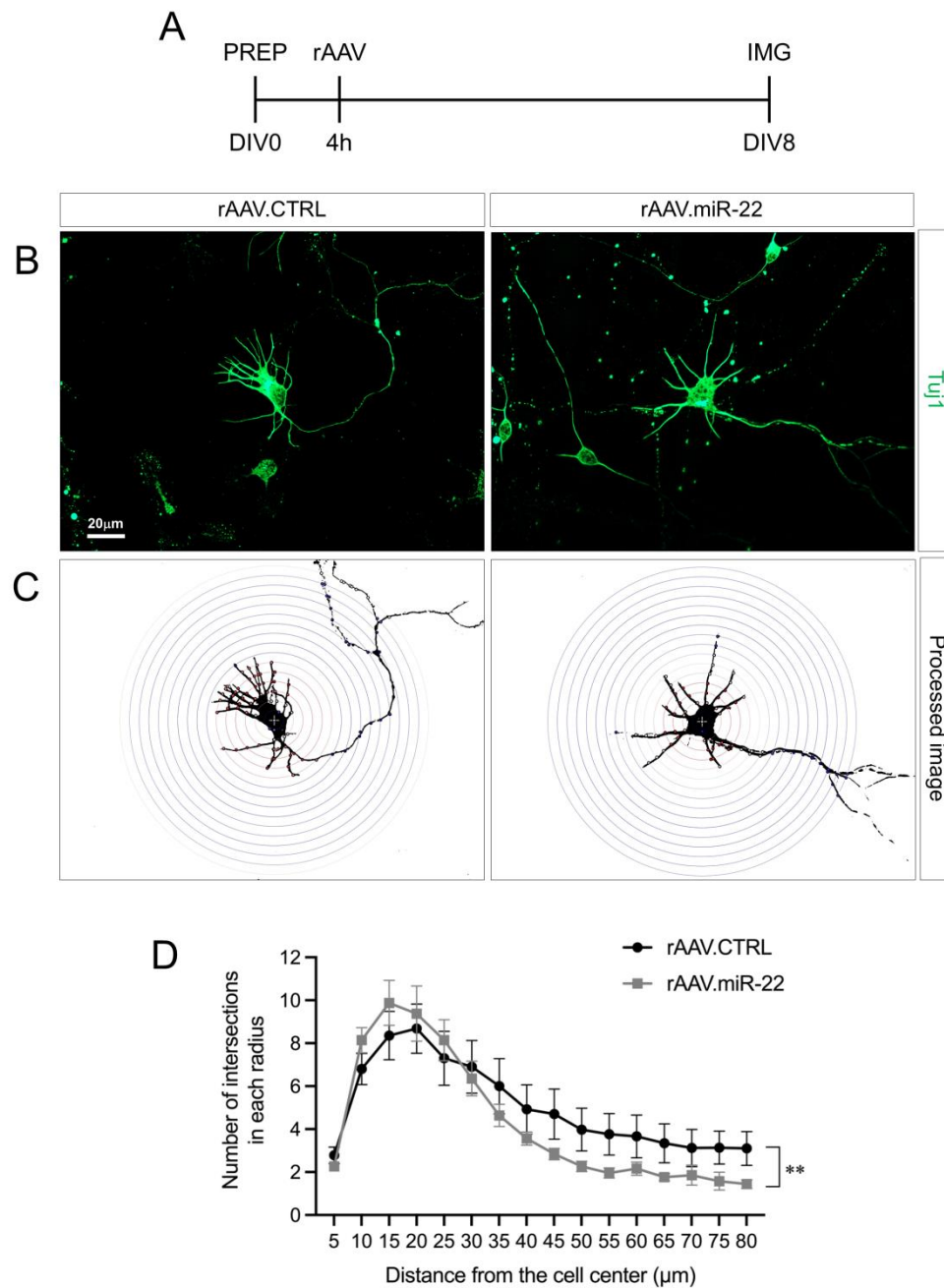


Figura 8 - Efeito do rAAV.miR-22 na complexidade da arborização de neuritos. **A)** Desenho experimental para o ensaio de arborização de neuritos. PREP: realização da cultura de neurônios corticais primários. DIV: dia *in vitro*. rAAV: transdução com os vetores virais. IMG: obtenção de imagens de microscopia. **B)** Imagens obtidas no DIV8 por microscopia de fluorescência de neurônios transduzidos por rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 mostrando a marcação de β -III-tubulina Tuj-1 (verde). Barra de escala: 20 μ m. **C)** Imagens mostradas em B após processamento no software ImageJ para avaliação, por análise de Sholl, da arborização de neuritos. **D)** Quantificação do número de interseções entre neuritos e cada um dos raios estabelecidos (n = 5). Gráfico mostra média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística de acordo com teste two-way ANOVA (** P = 0,0098).

5.3 rAAV.miR-22 aumenta a regeneração de neuritos após lesão do tipo *scracth*

Para avaliar os efeitos do rAAV.miR-22 na regeneração de neuritos, a cultura primária de neurônios corticais foi preparada, 4 h após as células foram transduzidas com os vetores de rAAV (rAAV.miR-22 ou rAAV.CTRL), no DIV7 foi realizada lesão do tipo “*scratch*” e 24 horas depois foram feitas imagens utilizando microscópio de fluorescência (Figura 9A). A partir das imagens obtidas foi observada uma maior densidade de neuritos em regeneração no grupo rAAV.miR-22 comparando com o grupo rAAV.CTRL, evidenciada pela marcação da proteína fluorescente mCherry (Figura 9B). As análises quantitativas mostraram que, comparado ao grupo controle rAAV.CTRL, o grupo rAAV.miR-22 apresentou um aumento de aproximadamente $62\% \pm 17,6$ no comprimento total dos neuritos (axônios e dendritos) na área entre 100 μm e 200 μm posteriores à lesão (Figura 9C). Além disso, foi observado um aumento de cerca de $40\% \pm 8,9$ no número de neuritos que ultrapassavam a distância de 200 μm a partir da borda da lesão (Figura 9D). Os dados sugerem, portanto, que a transdução de neurônios do SNC com o vetor rAAV.miR-22 aumenta a regeneração de neuritos.

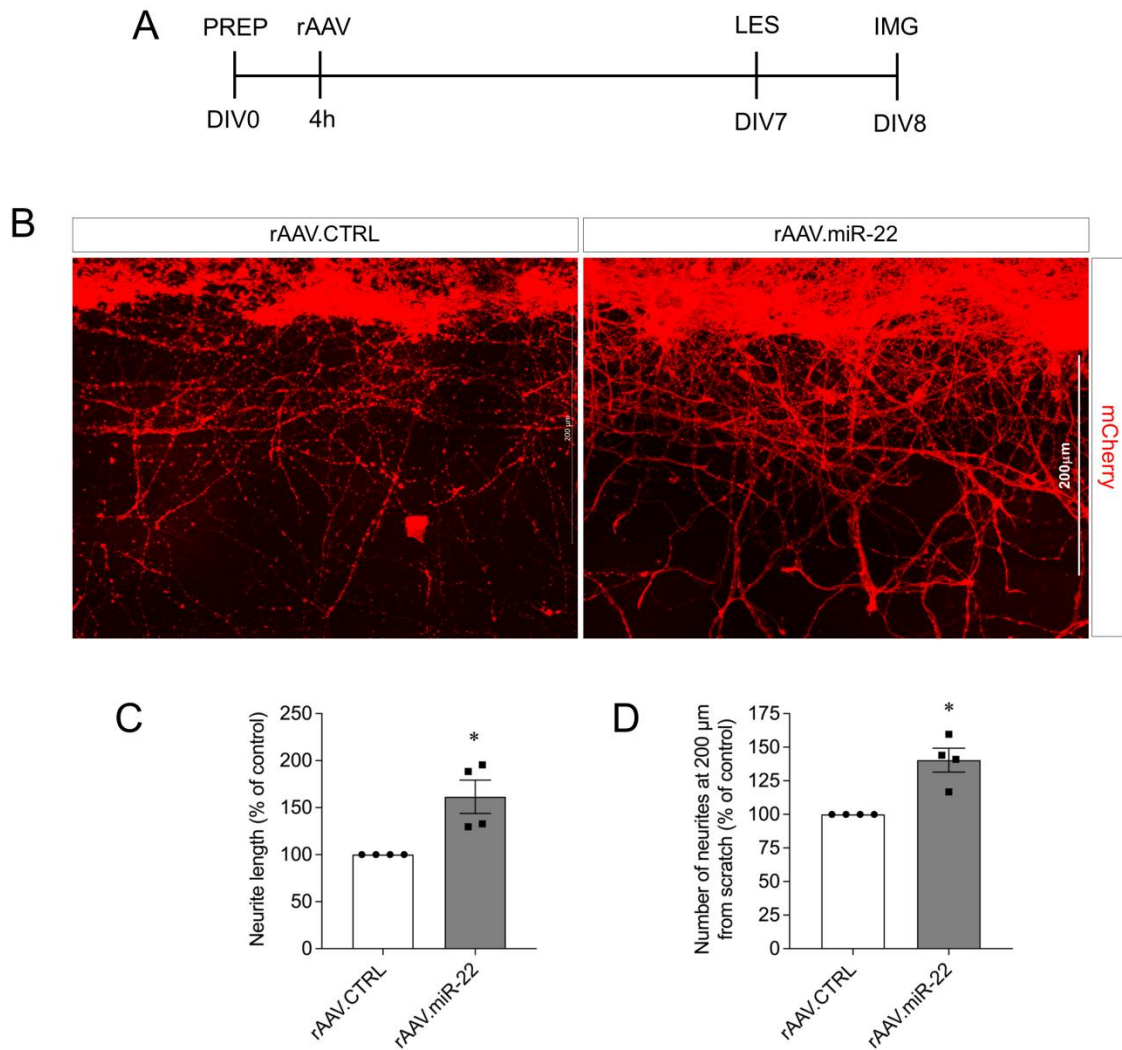


Figura 9 - Avaliação do efeito do rAAV.miR-22 na regeneração de neuritos. **A)** Desenho experimental para o ensaio de regeneração de neuritos. PREP: realização da cultura de neurônios corticais primários. DIV: dia *in vitro*. rAAV: transdução com os vetores virais. LES: lesão do tipo *scratch*. IMG: obtenção de imagens de microscopia. **B)** Imagens da expressão da proteína mCherry em neuritos em regeneração (vermelho) obtidas no DIV8 por microscopia de fluorescência de neurônios transduzidos com os vetores rAAV CTRL e rAAV.miR-22. Barra de escala: 200 μm. **C)** Quantificação do comprimento total de neuritos na área de 100 μm a 200 μm a partir da borda da lesão normalizado pelo grupo controle. **D)** Quantificação do número de neuritos que ultrapassaram a distância de 200 μm em relação à borda da lesão normalizado pelo grupo controle (n = 4). Gráfico mostra média ± erro padrão da média. Análise estatística de acordo com teste t de uma amostra (P = 0.04 e P = 0.02 para C e D, respectivamente).

5.4 Regeneração axonal de neurônios cultivados em câmaras microfluídicas é aumentada pelo rAAV.miR-22

Os experimentos de regeneração de axônios foram realizados a partir de cultura de neurônios corticais cultivados em câmaras microfluídicas. Após 24h do plaqueamento das células neuronais nas câmaras microfluídicas, estas foram transduzidas com os vetores rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 e no DIV7 foi realizada lesão especificamente nos axônios. Imagens dos axônios dos neurônios vivos expressando a proteína fluorescente mCherry nos microcanais e no compartimento axonal foram feitas antes da lesão e imediatamente (0h) e 48h após a lesão utilizando microscópio de fluorescência (Figura 10A-B). Foi calculado o índice de regeneração axonal no tempo de 48h e distâncias (200, 400 e 600 μm posteriores à lesão) através da quantificação do número de axônios em cada uma das distâncias analisadas, dividido pelo número de axônios na distância de 200 μm antes da lesão. O índice de regeneração axonal na distância de 200 μm da lesão aumentou significativamente de $0,28 \pm 0,1$ no grupo rAAV.CTRL para $1,1 \pm 0,2$ no grupo rAAV.miR-22 e na distância de 400 μm da lesão aumentou significativamente de $0,05 \pm 0,03$ no grupo rAAV.CTRL para $0,7 \pm 0,25$ no grupo rAAV.miR-22 (Figura 10C). Já na distância de 600 μm , o índice de regeneração axonal passou de $0,006 \pm 0,006$ no grupo rAAV.CTRL para $0,33 \pm 0,16$ no grupo rAAV.miR-22, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 10C). Os resultados apresentados sugerem, portanto, que o vetor rAAV.miR-22 promove regeneração axonal após lesão de neurônios corticais *in vitro*.

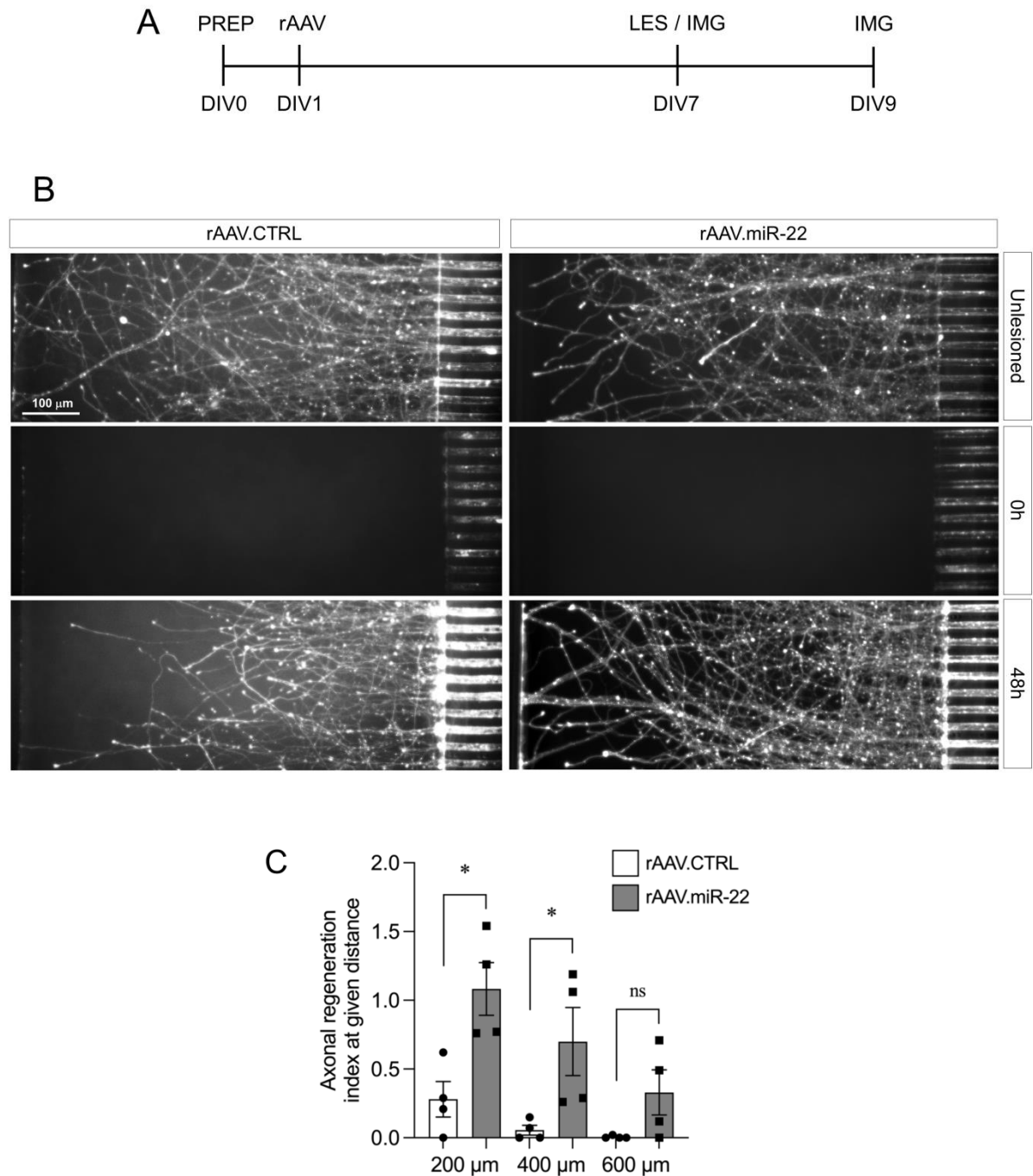


Figura 10 - Avaliação do efeito do rAAV.miR-22 na regeneração axonal. **A)** Desenho experimental para o ensaio de regeneração de axônios. PREP: realização da cultura de neurônios corticais primários e câmaras microfluídicas. DIV: dia *in vitro*. rAAV: transdução com os vetores de rAAV. LES: axotomia utilizando bomba de sucção. IMG: obtenção de imagens de microscopia em tempo real. **B)** Imagens obtidas no DIV9 por microscopia de fluorescência de neurônios transduzidos por rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 expressando a proteína mCherry (branco). Barra de escala: 100 μm. **C)** Quantificação do índice de regeneração axonal no tempo de 48h após a lesão nas distâncias de 200 μm, 400 μm e 600 μm a partir da borda da lesão (n = 4). Gráfico mostra média ± erro padrão da média. Análise estatística de acordo com teste t não pareado para cada tempo e distância (* P<0,05).

5.5 rAAV.miR-22 não interfere na degeneração axonal após axotomia de neurônios cultivados em câmaras microfluídicas

Para avaliar a degeneração axonal, os neurônios corticais plaqueados em câmaras microfluídicas foram transduzidos pelos vetores rAAV.CTRL ou rAAV.miR-22 no DIV1 e a lesão axonal foi realizada no DIV10. Neste experimento, utilizando microscópio de fluorescência, foram feitas imagens dos microcanais das câmaras microfluídicas antes da lesão (0 min) e imediatamente (5 min), 120, 240 e 360 min após a lesão (Figura 11A). As imagens obtidas permitiram identificar, através da expressão da proteína mCherry, a formação de inchaços nos axônios (Figura 11B), característica da degeneração axonal. Foi quantificado o número de inchaços axonais presentes antes da lesão (Figura 11C) e após a axotomia (Figura 10D) nos grupos rAAV.CTRL e rAAV.miR-22. A quantificação mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa no número de inchaços axonais antes da lesão comparando os grupos rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 (Figura 11C). Conforme publicado anteriormente (Vahsen *et al.*, 2020), observamos, com o passar do tempo, um aumento progressivo na formação de inchaços axonais, um sinal precoce de degeneração axonal, no grupo rAAV.CTRL e também no grupo rAAV.miR-22 (Figura 11D). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa no número de inchaços axonais em nenhum dos tempos analisados comparando os grupos rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 (Figura 11D). Esses dados sugerem que o vetor rAAV.miR-22 não tem efeito na degeneração axonal após lesão de neurônios corticais *in vitro*.

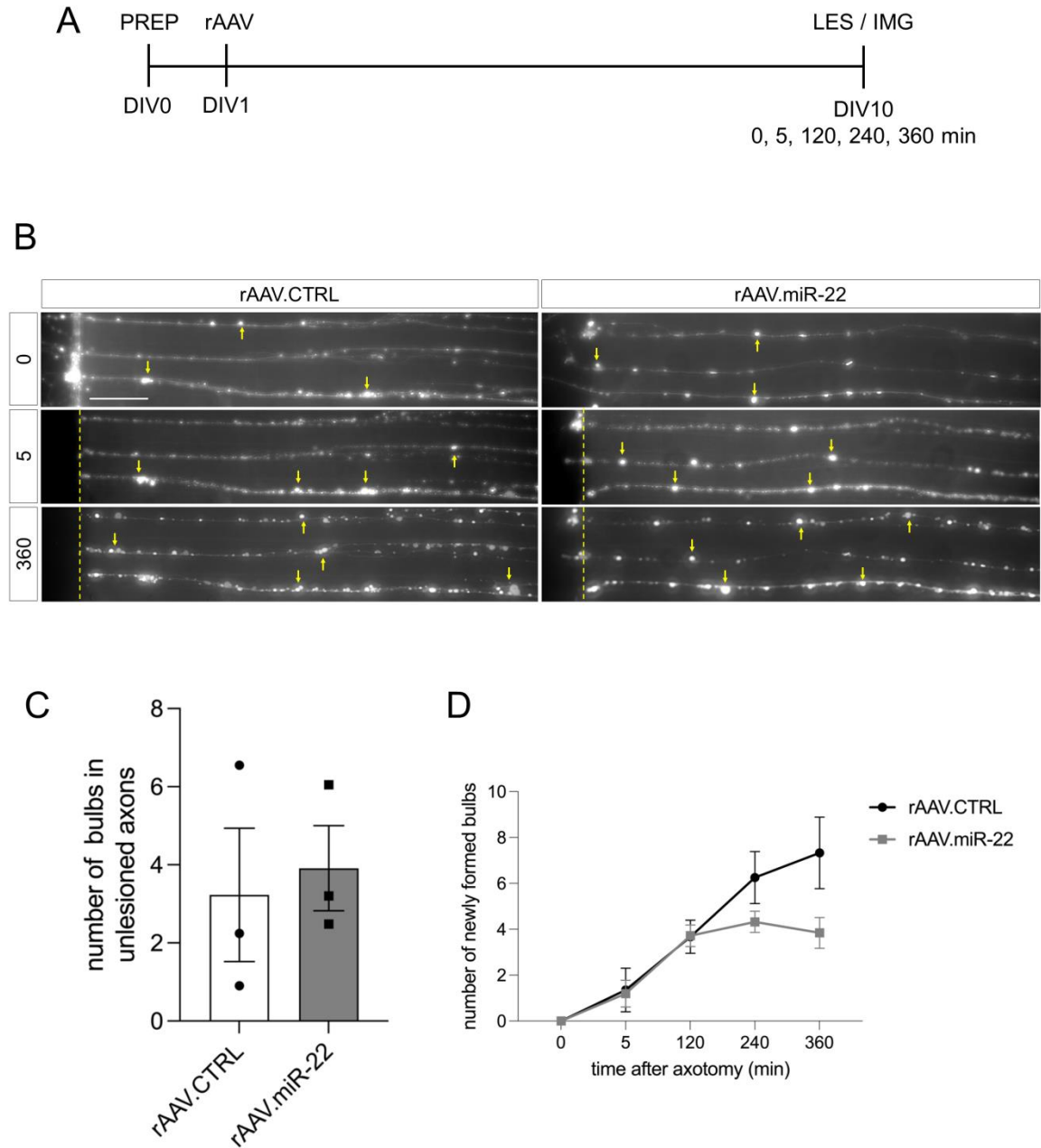


Figura 11 - Análise do efeito do rAAV.miR-22 na degeneração axonal. A) Desenho experimental para o ensaio de degeneração de axônios. PREP: realização da cultura de neurônios corticais primários. DIV: dia *in vitro*. rAAV: transdução com os vetores virais. LES: axotomia utilizando bomba de sucção. IMG: obtenção de imagens de microscopia em tempo real. **B)** Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em tempo real de axônios de neurônios vivos transduzidos com os vetores rAAV.CTRL e rAAV.miR-22 expressando a proteína mCherry (branco) no DIV10 anteriormente à lesão (0 min), 5 min e 360 min após a lesão. Linhas tracejadas mostram o local da lesão e setas amarelas indicam inchaços axonais. Barra de escala: 50 μ m. **C)** Quantificação do número de inchaços presentes nos axônios não lesionados. **D)** Quantificação do número de novos inchaços axonais formados após a axotomia ($n = 3$). Gráficos mostram média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística de acordo com o teste two-way ANOVA.

5.6 Análises de bioinformática para identificar possíveis mecanismos associados com os efeitos do rAAV.miR-22

A partir das análises *in silico* para obtenção dos mRNAs alvos do miR-22 utilizando a plataforma miRWalk e adotando-se um score de 0.8, foram obtidos 330 alvos preditos para a sequência hsa-miR-22-3p, dos quais 34 alvos já foram validados. Para os alvos preditos, foram realizadas análises de enriquecimento funcional utilizando dados de ontologia gênica e avaliando as categorias componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos. Entre os componentes celulares enriquecidos, evidencia-se a predominância daqueles associados à sinapse, como “espinhos neurais/dendríticos”, “especialização pós-sináptica” e “sinapse neurônio para neurônio” (Figura 12A). Entre as funções moleculares mais enriquecidas, destacam-se a “atividade da proteína cinase de receptor transmembrana”, “atividade modificadora de histonas” e “ligação de fator de transcrição de ligação ao DNA” (Figura 12B). Finalmente, para os processos biológicos é possível destacar que uma porção representativa dos genes alvos do miR-22 está associada com “crescimento de órgãos”, “migração neuronal”, “sinalização de proteína receptora transmembrana serina/treonina cinase” e “migração celular do tipo ameboidal” (Figura 12C).

Quanto aos alvos validados, a partir das buscas realizadas na plataforma PubMed, na qual cada um dos alvos foi associado a termos que englobam processos associados à neurodegeneração e regeneração, 6 dos 34 genes se destacaram por apresentarem papéis na degeneração, regeneração e morte neuronal (Tabela 1). Esses dados sugerem que o miR-22 possa estar regulando a expressão de genes associados com processos importantes no contexto de doenças neurodegenerativas.

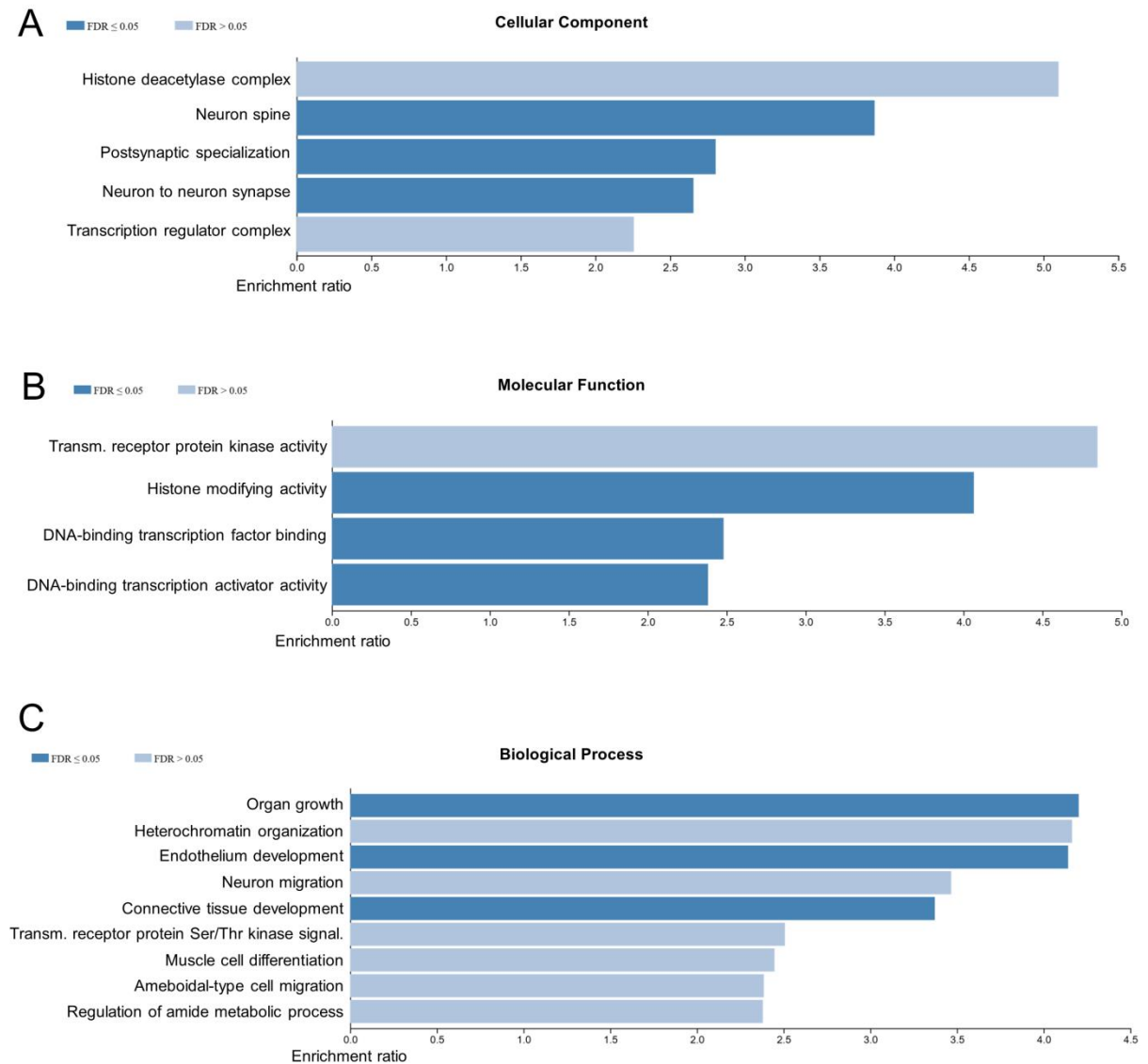


Figura 12 - Análises de enriquecimento funcional para os alvos preditos do miR-22. A) Componentes celulares B) Funções moleculares C) Processos biológicos.

Genes alvos	Funções	Referências
PTEN	Deleção promove regeneração axonal.	Park <i>et al.</i> , 2008; Shi <i>et al.</i> , 2024
NCOA1	Inibição reduz inflamação e contribui para efeito neuroprotetor.	Yu <i>et al.</i> , 2015
RGS2	Silenciamento promove neuroproteção.	Seredenina; Gokce; Luthi-Carter, 2011
HDCA4	Inibição promove regeneração de sinapses musculares e restauração da função sináptica.	Williams <i>et al.</i> , 2009; Mielcarek <i>et al.</i> , 2013
DDIT4	Disfunção, degeneração e morte neuronal; Inibição promove sobrevivência neuronal, regeneração axonal.	Malagelada <i>et al.</i> , 2010; Morgan-Warren <i>et al.</i> , 2016; Pérez-Sisqués <i>et al.</i> , 2021.
VSNL1	Aumenta a hiperfosforilação da proteína tau e provoca morte neuronal.	Schnurra <i>et al.</i> , 2001

Tabela 1 – Alvos validados do miR-22. Alvos validados do miR-22 com funções associadas a: SNC, neurodegeneração, neuroproteção, regeneração e degeneração axonal, sobrevivência neuronal, sinapse, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, Glaucoma e nervo óptico.

6. Discussão

Neste trabalho, utilizando vetores de rAAV como ferramenta de transferência gênica para a superexpressão do miR-22 foi observado que estes vetores são capazes de transduzir com alta eficiência neurônios corticais *in vitro*. Além disso, em cultura de neurônios corticais primários foi observado que o rAAV.miR-22 não apresenta efeitos diferenciais na arborização ou no crescimento de neuritos, mas em modelo de lesão do tipo “scratch” é capaz de promover regeneração significativa de neuritos na distância de 100 a 200 µm em relação á borda da lesão, além de apresentar um maior número de neuritos que ultrapassam a distância de 200 µm. Nos experimentos realizados em câmaras microfluídicas foi observado que o rAAV.miR-22 promove regeneração de axônios 48h após lesão axonal a 200 µm e 400 µm do local da lesão comparado ao grupo rAAV.CTRL. Em uma análise ainda preliminar, o rAAV.miR-22 parece não apresentar efeito significativo quanto à proteção dos axônios em degeneração. Já nas análises *in silico*, foi observado que os genes alvos do miR-22 apresentam funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares estreitamente relacionados a processos neurodegenerativos e vias de sinalização importantes para a neuroproteção e regeneração axonal.

6.1 MiR-22: arborização, crescimento e regeneração de neuritos, regeneração e degeneração axonal

Os resultados obtidos para arborização e crescimento de neuritos revelaram que a superexpressão do miR-22 não influenciou estas características quando comparado ao grupo controle. Estudos anteriores mostram que a deleção de PTEN, um dos genes alvos do miR-22, em células granulares do hipocampo leva à formação de árvores dendríticas maiores e com mais ramos dendríticos (Santos *et al.*, 2017). E a deleção desse mesmo gene em modelo *in vivo* de doença de Parkinson aumenta a sobrevivência e o crescimento de neuritos em neurônios dopaminérgicos (Zhang *et al.*, 2012). Contudo, vale ressaltar que diferentemente do silenciamento gênico promovido por miRNAs, que apenas reduzem a expressão de um gene, a deleção elimina permanentemente a sua expressão no organismo. Nossos dados indicam, portanto, que a regulação negativa da expressão dos genes alvos do miR-22 possivelmente não é eficiente em promover efeitos na ramificação e extensão de neuritos.

Outra hipótese seria de que em nosso estudo a transdução dos neurônios corticais com os vetores rAAV acontece no DIV0 e a expressão da proteína fluorescente mCherry geralmente pode ser detectada a partir do DIV3, quando o crescimento dos neuritos já aconteceu de modo significativo. Dessa forma, é possível sugerir que o intervalo entre o início da expressão dos vetores de rAAV e a realização das análises no DIV8 talvez não tenha sido suficiente para a observação de um efeito expressivo do miR-22 no crescimento e arborização de neuritos. Vale ressaltar que apesar de não avaliarmos diretamente a expressão do miR-22, uma das limitações do nosso trabalho, podemos correlacionar a expressão deste miRNA com a expressão de mCherry. Outro ponto a ser considerado é que já foi mostrado que o miR-22 encontra-se enriquecido no córtex em desenvolvimento, onde atua regulando a migração radial de neurônios (Volver *et al.*, 2014), portanto, sua expressão naturalmente mais alta nessa região poderia ter mascarado os efeitos do rAAV.miR-22 nas fases iniciais da cultura dos neurônios corticais E18. Para uma melhor conclusão sobre essas hipóteses seria necessário quantificar a expressão do miR-22 ao longo do tempo no nosso modelo, o que está previsto para experimentos futuros, e estabelecer um maior intervalo entre o início da expressão dos vetores virais e a realização das análises.

Por outro lado, foi averiguado que o rAAV.miR-22 é capaz de promover a regeneração de neuritos e axônios *in vitro*. Dessa forma, sugere-se que provavelmente para que os efeitos do miR-22 sejam observados é preciso que haja um contexto de lesão neuronal, isto é, os neuritos/axônios das células neuronais precisam passar por um processo de

desestabilização estrutural e fisiológica para que se observe o crescimento após a lesão, denominado regeneração. Além disso, ao considerarmos estes resultados para uma aplicação translacional, é importante salientar que para o desenvolvimento de uma terapia gênica, por exemplo, é desejável que os efeitos colaterais produzidos sejam mínimos. Nesse sentido, é interessante que o crescimento de neuritos ou axônios não seja exacerbado em neurônios não lesados e ocorra apenas em neurônios afetados por uma doença neurodegenerativa ou lesão traumática.

Neste caso, é possível sugerir ainda que, ao contrário do que foi observado para os dados de arborização e crescimento de neuritos, a regulação da expressão gênica pelo miR-22 parece ser crucial para a regeneração no SNC. A modulação de PTEN, por exemplo, gene diretamente relacionado à inibição de vias associadas à regeneração axonal (Park *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2024) pode representar um dos mecanismos pelos quais o miR-22 apresentou efeito regenerativo. Além disso, outros genes, que serão discutidos abaixo, também poderiam explicar os efeitos regenerativos do rAAV.miR-22. Os resultados observados, no entanto, revelaram que a regeneração de axônios promovida pelo rAAV.miR-22 ocorre apenas após um período de 48h e por curtas distâncias, não atingindo o comprimento de 600 µm em relação ao local da lesão. Para investigar melhor esses dados, portanto, seria pertinente observar os efeitos do rAAV.miR-22 por um maior período de tempo.

Quanto aos resultados obtidos para degeneração axonal, ao comparar grupo controle e grupo em que o miR-22 foi superexpresso, não houve diferença significativa em relação ao número de inchaços axonais formados nos períodos estabelecidos. Os inchaços axonais são estruturas que acumulam quantidades anormais de proteínas associadas a microtúbulos, organelas, vesículas e vacúolos e que representam sinais precoces de desintegração e degeneração axonal (Wang e He, 2009). Em modelos de doença de Alzheimer e em humanos inchaços axonais foram identificados em estágios iniciais da doença, precedendo, por exemplo, o aparecimento de outras alterações patológicas, como a deposição de beta amiloide (Stokin *et al.*, 2005). Dessa forma, além de prevenir a morte neuronal, proteger o axônio e retardar a degeneração axonal são estratégias importantes para evitar o agravamento de quadros neurodegenerativos. Em nosso estudo, ao considerarmos os resultados anteriores referentes à regeneração de neuritos e axônios, esperava-se que houvesse uma redução no número de inchaços axonais a partir da expressão do rAAV.miR-22, refletindo uma atenuação da degeneração axonal aguda, principalmente via modulação da dinâmica do citoesqueleto que se mostra alterada após axotomia. A hipótese que apresentamos é a de que o N amostral

não tenha sido suficiente para observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos e que, portanto, novos experimentos seriam necessários.

Este trabalho propõe um novo papel para o miR-22 no SNC após uma lesão. Até o momento, estudos que investigaram os efeitos da superexpressão do miR-22 em modelos de distúrbios neurodegenerativos, como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington, demonstraram que este miRNA apresenta ação neuroprotetora e anti-apoptótica, mas nenhum dado foi publicado quanto à degeneração e regeneração axonal (Jovicic *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Xie; Xie; Chen, 2024). Li *et al.* (2020) demonstraram que a aplicação de Agomir de miR-22-3p promove o crescimento de neuritos em neurônios sensoriais primários via regulação do eixo CBL/p-EGFR/p-STAT3/GAP43/p-GAP43, que é associado à habilidade intrínseca de regeneração axonal. Os neurônios sensoriais, no entanto, localizados no sistema nervoso periférico, encontram um ambiente mais permissivo, com fatores intrínsecos e extrínsecos diferentes daqueles que limitam a regeneração de neurônios do SNC, como é o caso dos neurônios corticais estudados em nosso trabalho (Huebner e Strittmatter, 2009). Os dados discutidos apontam o miR-22 como um potencial alvo para promoção da regeneração axonal no SNC, processo fundamental para recuperação da atividade neuronal e estabelecimento de conexões neurais em distúrbios neurodegenerativos.

6.2 MiR-22: análises de bioinformática e de enriquecimento funcional

Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o miR-22 promove regeneração axonal foram realizadas análises de bioinformática para os alvos preditos deste miRNA. Nestas análises foram avaliados o enriquecimento funcional dos genes nas categorias componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos.

6.2.1 Componentes celulares

Os resultados obtidos para componentes celulares revelaram que os genes alvos do miR-22 estão localizados em áreas associadas, sobretudo, à sinapse (“espinhas neuronais”, “especialização pós-sináptica” e “sinapse entre neurônios”) e ao complexo histona desacetilase.

Ao avaliarmos genes alvos do miR-22 individualmente foi observado que alguns deles apresentam papéis importantes na manutenção de sinapses no contexto de doenças neurodegenerativas, indicando sua possível relação com o controle da sinaptogênese,

regulação de sinapses e plasticidade sináptica. Pérez-Sisqués e colaboradores (2021), por exemplo, ao investigarem a expressão do Transcrito 4 induzível por dano ao DNA (DDIT4/RTP801/REDD1), alvo do miR-22, em condições fisiológicas, observaram que esse gene está localizado em sinapses, mais especificamente, em espinhas dendríticas e a sua deleção promove aumento da transmissão sináptica e melhora no aprendizado motor de camundongos. Tendo em vista que estas são funções comprometidas em diferentes doenças neurodegenerativas, a modulação do DDIT4 pelo miR-22 parece ser uma alternativa para o desenvolvimento de um tratamento para essas doenças. Já o *knockdown* do repressor transcricional Histona desacetilase 4 (HDAC4), outro gene alvo do miR-22, é capaz de reestabelecer a função sináptica neuronal e corticoestriatal, além de reduzir a formação de agregados citoplasmáticos e promover a melhora motora em animais modelos da doença de Huntington (Mielcarek *et al.*, 2013). Dessa forma, o silenciamento pós-transcricional desse gene pelo miR-22 pode representar uma das vertentes para o tratamento de pacientes com doença de Huntington.

HDAC4 é também um dos alvos diretamente relacionados a outro componente celular que se mostrou enriquecido nas análises *in silico*, o “complexo histona desacetilase”. As histonas desacetilases (HDACs) são enzimas que atuam removendo grupos acetil de histonas, resultando na formação de uma cromatina mais compacta e condensada e, consequentemente, na repressão da transcrição de mRNAs (Chen e Shifman, 2016). Estudos mostram que a inibição de HDACs resulta no crescimento neuronal e no aumento da taxa de cones de crescimento não colapsados em neurônios granulares cerebelares e, em modelo de esclerose lateral amiotrófica (ELA) reduz a morte de motoneurônios, a taxa de gliose e a degeneração axonal (Gaub *et al.*, 2010; Yoo e Ko, 2011). Além disso, a modulação de HDAC4 via expressão do miR-206, também em modelo de ELA, promove regeneração de sinapses neuromusculares e facilita a reinervação de músculos (Williams *et al.*, 2009). Revelando, portanto, mais uma vez, a importância da regulação deste alvo pelo miR-22 diante também de sua provável relação com os efeitos regenerativos observados neste estudo. Além de ser um precedente para o estudo deste gene em outros processos neurodegenerativos.

Anteriormente, observamos que a superexpressão do miR-22 promove a regeneração de neuritos e axônios *in vitro*. Entretanto, em um contexto translacional, além da regeneração é fundamental que os prolongamentos axonais atinjam seus alvos e sejam capazes de estabelecer novas conexões. Ao considerar a localização celular e as funções dos alvos do miR-22 mencionados acima, portanto, especula-se que a modulação de genes associados à

sinapse possa contribuir para a recuperação funcional do neurônio lesionado. Ainda, com o objetivo de melhor investigar a atuação do miR-22 no reestabelecimento de sinapses, temos como perspectiva a realização de cultura de neurônios corticais primários em câmaras microfluídicas que permitem separar neurônios pré e pós-sinápticos e avaliar o comportamento desses dois grupos de células após lesão axonal.

6.2.2 Funções moleculares

Ao avaliarmos os resultados referentes às funções moleculares associadas aos genes alvos do miR-22, destacamos a “atividade de receptores transmembrana proteínas cinases”, a “modificação de histonas” e a “ligação de fatores de transcrição ao DNA”.

As cinases atuam modulando diversas cascatas de sinalização e, portanto, contribuem para a homeostase celular. A desregulação e superexpressão de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) ou cinase c-Jun N-terminal (JNK) estão associadas ao desenvolvimento de patologias humanas, como as doenças neurodegenerativas (Ahmed *et al.*, 2020). Por exemplo, utilizando modelo murino de ELA e levando em consideração a hiperativação de cinases nessa doença, Gibbs *et al.* (2018) mostraram que a inibição de p38 α /MAPK14 (alvo predito do miR-22) restaura o transporte axonal retrógrado nas células neuronais motoras, mecanismo importante para a formação de cones de crescimento e regeneração axonal. Outra proteína cinase que parece apresentar importantes funções no SNC e na regulação da sua capacidade intrínseca de regeneração é a JNK3 ou MAPK10, alvo predito do miR-22 também identificado neste trabalho. Apara *et al.* (2017) demonstraram que a interação entre JNK3 e o Fator de transcrição 9 semelhante a Krüppel (KLF9) inibe o crescimento de neuritos em CGRs e que a interrupção dessa interação promove regeneração axonal após lesão do nervo óptico. Fernandes *et al.* (2012) mostram ainda que em contexto de lesão axonal, a ativação das cinases JNK3 e JKN2 leva à morte de CGRs, enquanto a inibição de ambas, mas principalmente de JNK3, previne a morte celular.

A “atividade modificadora de histonas” e a “ligação de fatores de transcrição” são funções moleculares estreitamente relacionadas e que contribuem para regulação da expressão gênica. A modificação de histonas, por adição ou remoção de grupos acetil, metil ou fosfato leva ao remodelamento da cromatina e interfere no acesso e ligação de fatores de transcrição a essa estrutura de DNA (Hilton *et al.*, 2024). A desacetilação de histonas por HDACs, por exemplo, resulta em uma cromatina mais condensada e na repressão da transcrição (Park *et al.*, 2022). A acetilação e fosforilação de histonas, por outro lado, rompem interações

eletrostáticas entre DNA e histonas, tornando a cromatina menos compacta e mais acessível a fatores de transcrição (Bannister e Kouzarides, 2011). Já a metilação destas proteínas pode apresentar ambos efeitos, a depender do tipo de resíduo em histonas (lisina ou arginina) que será metilado (Cheng *et al.*, 2023). Estas funções moleculares interagem diretamente com o componente celular “complexo histona desacetilase” abordado anteriormente, reforçando a importância da regulação de HDACs que possam comprometer a transcrição de fatores pró-regenerativos, por exemplo.

Nesse sentido, a regulação da expressão de genes alvos do miR-22 associados à atividade de cinases, à alteração da estrutura de histonas e à ligação de fatores de transcrição pode ser fundamental para a promoção da regeneração axonal e para a atenuação de quadros neurodegenerativos.

6.2.3 Processos biológicos

Os resultados gerados pela análise de ontologia genética para os processos biológicos associados aos alvos do miR-22 mostraram o enriquecimento de diversos processos, dos quais se destacaram a “migração neuronal” e “migração celular do tipo ameboidal”, termos que se inter-relacionam e que são fundamentais no estudo da regeneração no SNC. A migração neuronal é um processo essencial durante o desenvolvimento, pois permite que neurônios imaturos, denominados neuroblastos, se desloquem da área germinativa até seus destinos finais, onde estabelecerão contatos com seus alvos, criando uma rede neural (Hatten *et al.*, 2002). Em mamíferos adultos, no entanto, a migração neuronal se restringe a determinadas áreas do encefálo, como o hipocampo e cerebelo (Ghashghaei; Lai; Anton, 2007).

O crescimento e regeneração axonal também podem ser considerados formas especializadas de migração neuronal. Nestes processos, axônios e neurônios se deslocam em resposta a sinais de orientação, como moléculas de sinalização (Song e Poo, 2001). No crescimento e regeneração axonal, no entanto, há a formação de cones de crescimento na extremidade do axônio que serão responsáveis por guiar o seu deslocamento. Estudos recentes sugerem que neurônios e cones de crescimento podem migrar por um movimento do tipo ameboide, isto é, uma migração na qual são requeridas menor força de adesão, menor interação com a matriz extracelular para propulsão da célula e que é independente de proteínas de superfície neuronal, como as integrinas (Santos *et al.*, 2020; Amini *et al.*, 2022). Os cones de crescimento são formados por um citoesqueleto constituído de filamentos de actina que se polimerizaram, impulsionando a formação de filopódios e lamelipódios, e

microtúbulos que se polimerizam e despolimerizam provocando o movimento de extensão e retração do prolongamento axonal e que se reorganizam diante de mudanças no microambiente (Rivas e Hatten, 1995; Nakajima; Sawada; Sawamoto, 2021; Nakajima *et al.*, 2024).

Diante de uma lesão, é essencial que os axônios danificados sejam capazes de formar novos cones de crescimento para que possam crescer e reestabelecer conexões neuronais. Portanto, é importante que haja a regulação de componentes intrínsecos e extrínsecos à célula neuronal que dificultam a formação dessas estruturas. Yukawa *et al.* (2005) mostraram, por exemplo, que o gene Sema4A induz o colapso de cones de crescimento em neurônios hipocámpais via Rho-cinase, atuando como o quimiorrepulsivo. Um estudo de Encinas *et al.* (1999) reforça esta característica dos genes codificadores de semaforinas ao revelar que o tratamento de explantes de células ganglionares da retina com SemaW ou Sema4F, alvo predito do miR-22, provoca aumento significativo no número de cones de crescimento colapsados quando comparado ao grupo controle. O estudo sugere ainda que SemaW é altamente expresso no período pós-natal e que por isso, também possa estar associado, por exemplo, ao remodelamento neuronal durante a regeneração.

Desse modo, é possível sugerir que a modulação, a partir da superexpressão do miR-22, de genes relacionados à migração neuronal e que se relacionam à organização do citoesqueleto, à formação de cones de crescimento e, mais especificamente, à orientação axonal, pode contribuir para a regeneração de axônios após lesão no SNC, ajudando a explicar alguns dos efeitos observados neste estudo.

6.2.4 Alvos do miR-22 e outros efeitos biológicos

Além dos alvos discutidos anteriormente, que estão diretamente relacionados à processos neurodegenerativos no SNC, como PTEN e HDCA4, destacaremos a seguir alguns genes cuja regulação pode ser fundamental para a neuroproteção e regeneração neuronal.

DDIT4/RTP801/REDD1 consiste em um dos alvos validados para o miR-22 e atua, não só na regulação sinapses como mencionado acima, como também no crescimento, na proliferação e na diferenciação celular a partir da inibição do alvo de rapamicina mTOR. Estudos mostram a relação deste gene com CGRs e sugerem seu possível envolvimento com neuropatias ópticas. Del Olmo-Aguado *et al.* (2013), por exemplo, observaram que DDIT4 encontra-se imunorreativa na retina de camundongos, ratos e humanos. Para avaliar os efeitos

de sua expressão nas células da retina, foram realizadas culturas de CGRs submetidas a estresses como exposição à luz azul e hipóxia, os quais de acordo com os autores, se assemelhavam àqueles associados à patogênese do Glaucoma. A exposição a estes insultos resultou no aumento da expressão de DDIT4 e em um maior número de células mortas, enquanto a regulação negativa deste gene por um siRNA reduziu a morte celular. Em outro estudo, Morgan-Warren *et al.* (2016) mostraram em modelo *in vivo* de lesão do nervo óptico que a inibição de DDIT4 apresenta efeito neuroprotetor em CGRs e permite o crescimento de axônios em regeneração por distâncias maiores, atingindo a região distal do nervo óptico.

DDIT4 também tem sido relacionado a doenças neurodegenerativas. Em modelos *in vitro* e *in vivo* da doença de Parkinson e em neurônios localizados na substância negra de pacientes com doença de Parkinson, a expressão deste gene se mostra aumentada. DDIT4 contribui para degeneração e morte de células neuronais em modelo de doença de Parkinson ao interagir com o Complexo da esclerose tuberosa 2 (TSC2), inibindo a atividade de mTOR e regulando negativamente os níveis de Akt fosforilada, cinase anti-apoptótica essencial para a sobrevivência neuronal (Malagelada *et al.*, 2006; Malagelada; Jin; Greene, 2008). Em pacientes com a doença de Alzheimer e modelos experimentais da doença, DDIT4 também tem sua expressão aumentada. A regulação negativa desse gene *in vivo* promove melhora na capacidade cognitiva dos animais e reduz efeitos inflamatórios como astrogliose e microgliose (Pérez-Sisqués *et al.*, 2021).

MAPK14 ou p38, um dos alvos preditos do miR-22 já mencionados acima, tem sido fortemente relacionado à doença de Alzheimer, sobretudo, por ser ativado em resposta a estímulos estressores, como citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (Lee e Kim, 2017). p38 é ativado nos estágios iniciais da doença de Alzheimer e está localizado principalmente em locais de degeneração granulovacuolar que compreende a formação de vacúolos citoplasmáticos em neurônios do hipocampo, por exemplo, e que consiste em uma das características neuropatológicas associadas à doença (Sun *et al.*, 2003). A inibição de p38 α em modelo *in vivo* de doença de Alzheimer promove a degradação de Beta secretase 1 (BACE1), enzima responsável por clivar o precursor amiloide (APP), reduzindo, portanto, a deposição de beta-amiloide no cérebro. Além disso, a redução da expressão desse gene também aumenta a autofagia neuronal, processo que é comprometido na doença de Alzheimer, mas fundamental para a degradação de debris celulares, agregados proteicos e proteínas anormais (Peric e Annaert, 2015; Schnöder *et al.*, 2016). Ji *et al.* (2019) já evidenciariam os efeitos da superexpressão do miR-22 na regulação de MAPK14. Neste caso,

também foi observada uma redução na deposição de β -amiloide, além de uma melhora na memória espacial do grupo tratado.

SOX9 é um fator de transcrição associado ao desenvolvimento de neurônios e células da glia, à neurogênese e sinaptogênese no SNC (Vogel e Wegner, 2021; Song *et al.*, 2024). Apesar de não ter sido listado como gene alvo validado ou predito do miR-22 em nossas análises de bioinformática, Xia *et al.* (2022) identificaram e validaram SOX9 como alvo deste miRNA a partir de análises de proteômica, ensaio de luciferase e Western blot. Neste mesmo estudo foi demonstrado que a superexpressão do miR-22, em modelo da doença de Alzheimer, reduz a expressão de SOX9 na via NF- κ B, promove o aumento de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, a redução de proteínas pró-apoptóticas Bax e consequentemente, redução do número de células apoptóticas. Os autores observaram, ainda, redução na deposição de A β e melhora na habilidade cognitiva dos animais. Além disso, SOX9 também já foi identificado com um regulador positivo da expressão de CSPGs, proteoglicanos associados à formação de cicatriz glial em tecidos lesionados. A deleção condicional de SOX9 em camundongos submetidos a lesão da medula espinhal promove redução dos níveis de CSPG, aumento do brotamento reativo em axônios das células neuronais e melhora na capacidade locomotora, provocada, provavelmente, pela recuperação de inputs neurais na região caudal em relação à lesão (Mckillop *et al.*, 2016).

A identificação e regulação dos alvos do miR-22 mostra-se essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Como mostrado nos estudos anteriores, a expressão de alguns destes genes é desregulada no contexto de distúrbios neurodegenerativos. Nesse sentido, a detecção de variações na expressão desses genes pode ser um facilitador para o diagnóstico de diferentes doenças que acometem o SNC. Além disso, a regulação da expressão destes genes pelo miR-22 pode contribuir para a promoção da neuroproteção, regeneração axonal e sobrevivência de neurônios lesionados. Ao considerarmos os resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que os efeitos pró-regenerativos observados possivelmente são resultantes da modulação de alguns dos alvos destacados (PTEN, HDAC4, MAPK14, DDIT4 e SOX9), que serão avaliados futuramente.

7. Conclusão

Como evidenciado ao longo deste trabalho, os fatores intrínsecos ao SNC são importantes limitantes da regeneração axonal. A modulação destes fatores torna-se, portanto, essencial para a indução de uma resposta regenerativa diante de uma lesão neuronal. Dessa

forma, em nosso estudo sugerimos como alternativa a regulação da expressão gênica a partir de miRNAs. Aqui abordamos, especificamente, os efeitos da superexpressão do miR-22 em cultura de neurônios corticais primários submetidos ou não a uma lesão.

Nossos resultados mostram que o vetor rAAV.miR-22 não interfere na arborização e crescimento de neuritos ou na degeneração axonal, mas é capaz de promover a regeneração de neuritos e axônios em neurônios corticais utilizando diferentes modelos *in vitro*. Além disso, análises de bioinformática nos forneceram os alvos preditos e validados do miR-22 e análises funcionais realizadas para os alvos preditos nos revelaram potenciais genes associados à resposta regenerativa observada. Desse modo, a superexpressão do miR-22 mediada por rAAV parece ser uma estratégia promissora para a promoção da regeneração e reparo de neurônios lesionados no SNC, podendo constituir, futuramente, uma ferramenta de terapia gênica para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

8. Referências bibliográficas

- AARTS, Michelle et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 863-877, 2003.
- AHMED, Touqeer et al. Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration. **Pharmacological research**, v. 160, p. 105090, 2020.
- ALI, Mohammad Ishaque et al. The tissue specific regulation of miR22 expression in the lung and brain by ribosomal protein L29. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16242, 2020.
- ALMEIDA SILVA, Luiz F. et al. Genetic deletion of microRNA-22 blunts the inflammatory transcriptional response to status epilepticus and exacerbates epilepsy in mice. **Molecular Brain**, v. 13, p. 1-15, 2020.
- AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.
- AMINI, Rana et al. Amoeboid-like migration ensures correct horizontal cell layer formation in the developing vertebrate retina. **Elife**, v. 11, p. e76408, 2022.
- ANDREONE, Benjamin J.; LARHAMMAR, Martin; LEWCOCK, Joseph W. Cell death and neurodegeneration. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 12, n. 2, p. a036434, 2020.
- APARA, Akintomide et al. KLF9 and JNK3 interact to suppress axon regeneration in the adult CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 40, p. 9632-9644, 2017.
- BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.
- BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BARTLETT, Jeffrey S.; WILCHER, Rose; SAMULSKI, R. Jude. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. **Journal of virology**, v. 74, n. 6, p. 2777-2785, 2000.
- BEAMER, Edward H. et al. MicroRNA-22 controls aberrant neurogenesis and changes in neuronal morphology after status epilepticus. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 11, p. 442, 2018.
- BERRY, Garrett Edward; ASOKAN, Aravind. Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors. **Current opinion in virology**, v. 21, p. 54-60, 2016.
- BITO, Haruhiko et al. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. **Neuron**, v. 26, n. 2, p. 431-441, 2000.
- BREDESEN, Dale E.; RAO, Rammohan V.; MEHLEN, Patrick. Cell death in the nervous system. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 796-802, 2006.

BUCHLI, Anita D.; SCHWAB, Martin E. Inhibition of Nogo: a key strategy to increase regeneration, plasticity and functional recovery of the lesioned central nervous system. **Annals of medicine**, v. 37, n. 8, p. 556-567, 2005.

CAFFERTY, William BJ et al. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 20, p. 6825-6837, 2010.

CARROLL, Austin H. et al. An Update on Spinal Cord Injury and Current Management. **JBJS reviews**, v. 12, n. 10, p. e24, 2024.

CHEN, Jie; SHIFMAN, Michael I. The expression of histone deacetylases and the regenerative abilities of spinal-projecting neurons after injury. **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 10, p. 1577-1578, 2016.

CHENG, Yating et al. Epigenetic and epitranscriptomic regulation of axon regeneration. **Molecular psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 1440-1450, 2023.

CHI, Hao; CHANG, Hui-Yun; SANG, Tzu-Kang. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3082, 2018.

DEL OLMO-AGUADO, Susana et al. RTP801 immunoreactivity in retinal ganglion cells and its down-regulation in cultured cells protect them from light and cobalt chloride. **Brain research bulletin**, v. 98, p. 132-144, 2013.

DELIZ, Juan R.; TANNER, Caroline M.; GONZALEZ-LATAPI, Paulina. Epidemiology of Parkinson's Disease: An Update. **Current neurology and neuroscience reports**, p. 1-17, 2024.

DERGHAM, Pauline et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6570-6577, 2002.

DING, Yi; CHEN, Qin. mTOR pathway: a potential therapeutic target for spinal cord injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112430, 2022.

DOUAR, Anne-Marie et al. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. **Journal of virology**, v. 75, n. 4, p. 1824-1833, 2001.

DUAN, Dongsheng et al. Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. **Virology**, v. 261, n. 1, p. 8-14, 1999.

DZIEDZIC, Tomasz et al. Wallerian degeneration: a major component of early axonal pathology in multiple sclerosis. **Brain pathology**, v. 20, n. 5, p. 976-985, 2010.

ECHEVERRI, Karen. The various routes to functional regeneration in the central nervous system. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 47, 2020.

ENCINAS, Jeffrey A. et al. Cloning, expression, and genetic mapping of Sema W, a member of the semaphorin family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 5, p. 2491-2496, 1999.

ERTÜRK, Ali et al. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 34, p. 9169-9180, 2007.

EVANS, Teresa A. et al. High-resolution intravital imaging reveals that blood-derived macrophages but not resident microglia facilitate secondary axonal dieback in traumatic spinal cord injury. **Experimental neurology**, v. 254, p. 109-120, 2014.

FAN, Hao et al. Cellular regeneration treatments for traumatic brain injury. **Medicine in Novel Technology and Devices**, v. 16, p. 100182, 2022.

FAWCETT, James W. The struggle to make CNS axons regenerate: why has it been so difficult?. **Neurochemical research**, v. 45, n. 1, p. 144-158, 2020.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss**, 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss>>. Acesso em: 04 de janeiro de 2025.

FERNANDES, Kimberly A. et al. JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death. **Neurobiology of disease**, v. 46, n. 2, p. 393-401, 2012.

FIERINI, Fabio. Mixed dementia: Neglected clinical entity or nosographic artifice?. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 410, p. 116662, 2020.

FILIPOWICZ, Witold; BHATTACHARYYA, Suvendra N.; SONENBERG, Nahum. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. **Nature reviews genetics**, v. 9, n. 2, p. 102-114, 2008.

FRICKER, Michael et al. Neuronal cell death. **Physiological reviews**, v. 98, n. 2, p. 813-880, 2018.

GAO, Jie; HUSSAIN, Rehan M.; WENG, Christina Y. Voretigene neparvovec in retinal diseases: a review of the current clinical evidence. **Clinical Ophthalmology**, p. 3855-3869, 2020.

GAO, Jingjing et al. Gene therapy for CNS disorders: modalities, delivery and translational challenges. **Nature Reviews Neuroscience**, p. 1-20, 2024.

GAUB, Perrine et al. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1392-1408, 2010.

GEBERT, Luca FR; MACRAE, Ian J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 1, p. 21-37, 2019.

GEOFFROY, Marie-Claude; SALVETTI, Anna. Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. **Current gene therapy**, v. 5, n. 3, p. 265-271, 2005.

GHASHGHAEE, H. Troy; LAI, Cary; ANTON, E. S. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet?. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 141-151, 2007.

GIBBS, Katherine L. et al. Inhibiting p38 MAPK alpha rescues axonal retrograde transport defects in a mouse model of ALS. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 596, 2018.

GOLDBERG, Ethan M.; COULTER, Douglas A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 337-349, 2013.

GORMAN, Adrienne M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2263-2280, 2008.

GOVONI, Alessandra et al. Time is motor neuron: therapeutic window and its correlation with pathogenetic mechanisms in spinal muscular atrophy. **Molecular neurobiology**, v. 55, p. 6307-6318, 2018.

GRANDPRÉ, Tadzia et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 439-444, 2000.

GRIEGER, Joshua C.; SAMULSKI, R. Jude. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. **Methods in enzymology**, v. 507, p. 229-254, 2012.

HATTEN, Mary E. New directions in neuronal migration. **Science**, v. 297, n. 5587, p. 1660-1663, 2002.

HE, Zhigang; JIN, Yishi. Intrinsic control of axon regeneration. **Neuron**, v. 90, n. 3, p. 437-451, 2016.

HERMS, Jochen; DOROSTKAR, Mario M. Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 221-250, 2016.

HILL, Caitlin E. A view from the ending: Axonal dieback and regeneration following SCI. **Neuroscience letters**, v. 652, p. 11-24, 2017.

HILTON, Brett J. et al. Neuronal maturation and axon regeneration: Unfixing circuitry to enable repair. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 649-667, 2024.

HOSHIBA, Yoshio et al. Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 21, p. 5775-5784, 2016.

HU, Jianli et al. Chondroitinase ABC promotes axon regeneration and reduces retrograde apoptosis signaling in lamprey. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 653638, 2021.

HU, Jianli; JIN, Li-Qing; SELZER, Michael E. Inhibition of central axon regeneration: perspective from chondroitin sulfate proteoglycans in lamprey spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 9, p. 1955-1956, 2022.

HUEBNER, Eric A.; STRITTMATTER, Stephen M. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. **Cell biology of the axon**, p. 305-360, 2009.

HUNTZINGER, Eric; IZAURRALDE, Elisa. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99-110, 2011.

HUTCHISON, Emmette R.; OKUN, Eitan; MATTSON, Mark P. The therapeutic potential of microRNAs in nervous system damage, degeneration, and repair. **Neuromolecular medicine**, v. 11, p. 153-161, 2009.

IDDA, M. Laura et al. Noncoding RNAs in Alzheimer's disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 9, n. 2, p. e1463, 2018.

Jl, Benxiu et al. Assessment of functional recovery and axonal sprouting in oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) null mice after spinal cord injury. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 258-267, 2008.

Jl, Qiling et al. MiR-22-3p regulates amyloid β deposit in mice model of Alzheimer's disease by targeting mitogen-activated protein kinase 14. **Current neurovascular research**, v. 16, n. 5, p. 473-480, 2019.

JIMENEZ-MATEOS, Eva M. et al. microRNA targeting of the P2X7 purinoceptor opposes a contralateral epileptogenic focus in the hippocampus. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 17486, 2015.

JOHNSON, Rory et al. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. **Neurobiology of disease**, v. 29, n. 3, p. 438-445, 2008.

JOVIČIĆ, Ana et al. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 12, p. 5127-5137, 2013.

JOVICIC, Ana et al. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54222, 2013.

JUNGERS, Courtney F.; DJURANOVIC, Sergej. Modulation of miRISC-mediated gene silencing in eukaryotes. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 9, p. 832916, 2022.

KAO, C. C.; CHANG, Louis W.; BLOODWORTH JR, J. M. B. Electron microscopic observations of the mechanisms of terminal club formation in transected spinal cord axons. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 36, n. 1, p. 140-156, 1977.

KATOH, Hironori et al. p160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 5, p. 2489-2492, 1998.

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

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

KOMATSU, Masaaki et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 880-884, 2006.

KOTOWSKA-ZIMMER, Anna et al. A CAG repeat-targeting artificial miRNA lowers the mutant huntingtin level in the YAC128 model of Huntington's disease. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 28, p. 702-715, 2022.

KUMAR, R.; HERBERT, P. E.; WARRENS, A. N. An introduction to death receptors in apoptosis. **International Journal of Surgery**, v. 3, n. 4, p. 268-277, 2005.

LEE, Jong Kil; KIM, Nam-Jung. Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1287, 2017.

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. 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.

LEE, Yoontae et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LEE, Yoontae et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-419, 2003.

LEHMANN, Maxine et al. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 17, p. 7537-7547, 1999.

LEWIS, Benjamin P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-798, 2003.

LI, Bo et al. miR-22-3p enhances the intrinsic regenerative abilities of primary sensory neurons via the CBL/p-EGFR/p-STAT3/GAP43/p-GAP43 axis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 5, p. 4605-4617, 2020.

LI, Shijie; LEI, Zhixin; SUN, Taolei. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. **Cell Biology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 53-83, 2023.

LIEBSCHER, Thomas et al. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 58, n. 5, p. 706-719, 2005.

LINGOR, Paul et al. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. **Cell and tissue research**, v. 349, p. 289-311, 2012.

LIU, Kai et al. Neuronal necrosis is regulated by a conserved chromatin-modifying cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 38, p. 13960-13965, 2014.

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

LLORET, A. et al. Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 186-191, 2015.

LUO, Liqun; O'LEARY, Dennis DM. Axon retraction and degeneration in development and disease. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 28, n. 1, p. 127-156, 2005.

MA, Ji et al. microRNA-22 attenuates neuronal cell apoptosis in a cell model of traumatic brain injury. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 4, p. 1895, 2016.

MALAGELADA, Cristina et al. Rapamycin Protects against Neuron Death in In Vitro and In Vivo Models of Parkinson's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 3, p. 1166-1175, 2010.

MALAGELADA, Cristina et al. RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 39, p. 9996-10005, 2006.

MALAGELADA, Cristina; JIN, Zong Hao; GREENE, Lloyd A. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 53, p. 14363-14371, 2008.

MARGIS, Regina; MARGIS, Rogério; RIEDER, Carlos RM. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. **Journal of biotechnology**, v. 152, n. 3, p. 96-101, 2011.

MCKEE, Ann C.; DANESHVAR, Daniel H. The neuropathology of traumatic brain injury. **Handbook of clinical neurology**, v. 127, p. 45-66, 2015.)

MCKERRACHER, Lisa; ROSEN, Kenneth M. MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 8, p. 51, 2015.

MCKILLOP, William M. et al. Conditional Sox9 ablation improves locomotor recovery after spinal cord injury by increasing reactive sprouting. **Experimental neurology**, v. 283, p. 1-15, 2016.

MEHTA, Saloni T. et al. Hyperactivated Stat3 boosts axon regeneration in the CNS. **Experimental neurology**, v. 280, p. 115-120, 2016.

MIELCAREK, Michal et al. HDAC4 reduction: a novel therapeutic strategy to target cytoplasmic huntingtin and ameliorate neurodegeneration. **PLoS biology**, v. 11, n. 11, p. e1001717, 2013.

MIKOL, Daniel D.; GULCHER, Jeffrey R.; STEFANSSON, Kari. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. **The Journal of cell biology**, v. 110, n. 2, p. 471-479, 1990.

MOLASY, Milena et al. MicroRNAs in glaucoma and neurodegenerative diseases. **Journal of human genetics**, v. 62, n. 1, p. 105-112, 2017.

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

MORGAN-WARREN, Peter J. et al. siRNA-mediated knockdown of the mTOR inhibitor RTP801 promotes retinal ganglion cell survival and axon elongation by direct and indirect mechanisms. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 57, n. 2, p. 429-443, 2016.

NAKAJIMA, Chikako et al. Identification of the growth cone as a probe and driver of neuronal migration in the injured brain. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 1877, 2024.

NAKAJIMA, Chikako; SAWADA, Masato; SAWAMOTO, Kazunobu. Postnatal neuronal migration in health and disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 66, p. 1-9, 2021.

NATURE PORTFOLIO. **Neurodegeneration**, 2024. Disponível em: <<https://www.nature.com/subjects/neurodegeneration>>. Acesso em: 24 de novembro de 2024.

NIH – NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Traumatic Brain Injury (TBI)**, 2024. Disponível em: <<https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/traumatic-brain-injury-tbi>>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2025.

NIXON, Ralph A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nature medicine**, v. 19, n. 8, p. 983-997, 2013.

NIXON, Ralph A.; YANG, Dun-Sheng. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. **Neurobiology of disease**, v. 43, n. 1, p. 38-45, 2011.

NORSWORTHY, Michael W. et al. Sox11 expression promotes regeneration of some retinal ganglion cell types but kills others. **Neuron**, v. 94, n. 6, p. 1112-1120. e4, 2017.

O'BRIEN, Jacob et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 402, 2018.

OGBONMIDE, Tolu et al. Gene therapy for spinal muscular atrophy (SMA): A review of current challenges and safety considerations for onasemnogene abeparvovec (Zolgensma). **Cureus**, v. 15, n. 3, 2023.

OHTAKE, Yosuke; LI, Shuxin. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. **Brain research**, v. 1619, p. 22-35, 2015.

OKADA, Chimari et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1275-1279, 2009.

PARK, Jisu et al. The role of histone modifications: from neurodevelopment to neurodiseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 217, 2022.

PARK, Keun Woo; LIN, Ching-Yi; LEE, Yu-Shang. Expression of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) and its role in neuronal death after complete spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 65-75, 2014.

PARK, Kevin Kyungsuk 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.

PÉREZ-SISQUÉS, Leticia et al. RTP801 regulates motor cortex synaptic transmission and learning. **Experimental Neurology**, v. 342, p. 113755, 2021.

PÉREZ-SISQUÉS, Leticia et al. RTP801/REDD1 contributes to neuroinflammation severity and memory impairments in Alzheimer's disease. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 6, p. 616, 2021.

PERIC, Aleksandar; ANNAERT, Wim. Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction?. **Acta neuropathologica**, v. 129, p. 363-381, 2015.

PERNET, Vincent et al. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 29, p. 7435-7444, 2008.

- QIN, Song; ZOU, Yuhua; ZHANG, Chun-Li. Cross-talk between KLF4 and STAT3 regulates axon regeneration. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 2633, 2013.
- QU, Yuan et al. Characteristics and advantages of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy for neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 6, p. 931-938, 2019.
- RIBAS, Vinicius Toledo et al. AAV-mediated inhibition of ULK1 promotes axonal regeneration in the central nervous system in vitro and in vivo. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 2, p. 213, 2021.
- RIBAS, Vinicius Toledo 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.
- RIVAS, Rodolfo J.; HATTEN, Mary E. Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 981-989, 1995.
- RODRIGUEZ, Antony et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome research**, v. 14, n. 10a, p. 1902-1910, 2004.
- SANTOS, Telma E. et al. Axon growth of CNS neurons in three dimensions is amoeboid and independent of adhesions. **Cell reports**, v. 32, n. 3, 2020.
- SANTOS, Victor R. et al. PTEN deletion increases hippocampal granule cell excitability in male and female mice. **Neurobiology of disease**, v. 108, p. 339-351, 2017.
- SCHNÖDER, Laura et al. Deficiency of neuronal p38 α MAPK attenuates amyloid pathology in Alzheimer disease mouse and cell models through facilitating lysosomal degradation of BACE1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2067-2079, 2016.
- SCHNURRA, I. et al. The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and extracellular tangles in Alzheimer's disease and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro: a link between calcium sensors and Alzheimer's disease?. **Neurobiology of disease**, v. 8, n. 5, p. 900-909, 2001.
- SEREDENINA, Tamara; GOKCE, Ozgun; LUTHI-CARTER, Ruth. Decreased striatal RGS2 expression is neuroprotective in Huntington's disease (HD) and exemplifies a compensatory aspect of HD-induced gene regulation. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22231, 2011.
- SHAHSAVANI, Narjes; KATARIA, Hardeep; KARIMI-ABDOLREZAEI, Soheila. Mechanisms and repair strategies for white matter degeneration in CNS injury and diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 6, p. 166117, 2021.
- SHANG, Renfu et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 24, n. 12, p. 816-833, 2023.
- SHI, Ziyu et al. Reversing Persistent PTEN Activation after Traumatic Brain Injury Fuels Long-Term Axonal Regeneration via Akt/mTORC1 Signaling Cascade. **Advanced Science**, p. 2410136, 2024.
- SHUSHARINA, Natalia et al. Modern methods of diagnostics and treatment of neurodegenerative diseases and depression. **Diagnostics**, v. 13, n. 3, p. 573, 2023.

SILVER, Jerry; MILLER, Jared H. Regeneration beyond the glial scar. **Nature reviews neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 146-156, 2004.

SIMONEN, Marjo et al. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. **Neuron**, v. 38, n. 2, p. 201-211, 2003.

SIMONS, Mikael; MISGELD, Thomas; KERSCHENSTEINER, Martin. A unified cell biological perspective on axon–myelin injury. **Journal of Cell Biology**, v. 206, n. 3, p. 335-345, 2014.

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

SMITH, Patrice D. et al. SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. **Neuron**, v. 64, n. 5, p. 617-623, 2009.

SONG, Hong-jun; POO, Mu-ming. The cell biology of neuronal navigation. **Nature cell biology**, v. 3, n. 3, p. E81-E88, 2001.

SONG, Xiaolei et al. The SoxE factor Sox9 is selectively expressed in indirect pathway striatal projection neurons and regulates synaptogenesis. **Fundamental Research**, 2024.

SRIVASTAVA, Arun; LUSBY, E. W.; BERNIS, KENNETH I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. **Journal of virology**, v. 45, n. 2, p. 555-564, 1983.

STEINMETZ, Jaimie D. et al. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Neurology**, v. 23, n. 4, p. 344-381, 2024.

STOKIN, Gorazd B. et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1282-1288, 2005.

SUMMERFORD, Candace; BARTLETT, Jeffrey S.; SAMULSKI, Richard Jude. $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. **Nature medicine**, v. 5, n. 1, p. 78-82, 1999.

SUN, Anyang et al. P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. **Experimental neurology**, v. 183, n. 2, p. 394-405, 2003.

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

SWITON, Katarzyna et al. Molecular neurobiology of mTOR. **Neuroscience**, v. 341, p. 112-153, 2017.

SYNTICHAKI, Popi; TAVERNARAKIS, Nektarios. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 672-684, 2003.

TANG, Song et al. Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 259-269, 2001.

THOMAS, Clare E.; EHRHARDT, Anja; KAY, Mark A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 5, p. 346-358, 2003.

TIAN, Ting; ZHANG, Sensen; YANG, Maojun. Recent progress and challenges in the treatment of spinal cord injury. **Protein & cell**, v. 14, n. 9, p. 635-652, 2023.

VAHSEN, Björn Friedhelm 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.

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

VENKATESH, Ishwariya et al. Epigenetic profiling reveals a developmental decrease in promoter accessibility during cortical maturation in vivo. **Neuroepigenetics**, v. 8, p. 19-26, 2016.

VOGEL, Julia K.; WEGNER, Michael. Sox9 in the developing central nervous system: a jack of all trades?. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 4, p. 676-677, 2021.

VOLVERT, Marie-Laure et al. MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. **Cell reports**, v. 7, n. 4, p. 1168-1183, 2014.

WANG, Dan; TAI, Phillip WL; GAO, Guangping. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 5, p. 358-378, 2019.

WANG, Jiang-Hui et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 78, 2024.

WANG, Jing; HE, Zhigang. NAD and axon degeneration: from the Wlds gene to neurochemistry. **Cell adhesion & migration**, v. 3, n. 1, p. 77-87, 2009.

WANG, Kevin C. et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 941-944, 2002.

WANG, Shu et al. The Expanding Burden of Neurodegenerative Diseases: An Unmet Medical and Social Need. **Aging and disease**, 2024.

WANG, Xue-Wei et al. Histone methyltransferase Ezh2 coordinates mammalian axon regeneration via regulation of key regenerative pathways. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 134, n. 3, 2024.

WANG, Yu et al. miR-22 exerts anti-alzheimic effects via the regulation of apoptosis of hippocampal neurons. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 15, p. 84-89, 2018.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**, 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2024.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**, 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2025.

WILLIAMS, Andrew H. et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1549-1554, 2009.

WINTER, Julia et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228-234, 2009.

WU, Ligang; BELASCO, Joel G. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. **Molecular cell**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2008.

XIA, Pengcheng et al. MicroRNA-22-3p ameliorates Alzheimer's disease by targeting SOX9 through the NF- κ B signaling pathway in the hippocampus. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 180, 2022.

XIE, Yuanrun; XIE, Dan; CHEN, Chao. Hsa_circ_0049472 contributed to amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity, apoptosis and inflammation via regulating PI3K-AKT signaling pathway by interacting with miR-22-3p/ZNF217 axis. **Brain Research Bulletin**, p. 111004, 2024.

YAMAKUCHI, Munekazu et al. MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20291, 2011.

YANG, Chao Ping et al. Neuroprotective role of microRNA-22 in a 6-hydroxydopamine-induced cell model of Parkinson's disease via regulation of its target gene TRPM7. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 60, p. 445-452, 2016.

YING, Howard S.; GOTTRON, Frank J.; CHOI, Dennis W. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 7.18. 1-7.18. 17, 2000.

YOO, Young-Eun; KO, Chien-Ping. Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental neurology**, v. 231, n. 1, p. 147-159, 2011.

YU, Houyou et al. Neuroprotective effects of viral overexpression of microRNA-22 in rat and cell models of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116, n. 2, p. 233-241, 2015.

YUKAWA, Kazunori et al. Semaphorin 4A induces growth cone collapse of hippocampal neurons in a Rho/Rho-kinase-dependent manner. **International journal of molecular medicine**, v. 16, n. 1, p. 115-118, 2005.

ZHANG, YaJun et al. PTEN deletion enhances survival, neurite outgrowth and function of dopamine neuron grafts to MitoPark mice. **Brain**, v. 135, n. 9, p. 2736-2749, 2012.

ZHONG, Li 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**, v. 105, n. 22, p. 7827-7832, 2008.

9. Anexos

ANEXO A – Certificado CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Modelos in vitro para testar o papel de moléculas na degeneração e regeneração axonal e sobrevivência neuronal.", protocolo do CEUA: 237/2018 sob a responsabilidade de Vinicius de Toledo Ribas que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 24/04/2023.

Vigência da Autorização	06/08/2018 a 05/08/2023
Prorrogação de Vigência da Autorização	06/08/2023 a 05/08/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	8g / 3(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	8g / 3(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar

Nº de animais	18
Peso/Idade	8g / 3(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	8g / 3(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	8g / 3(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	45
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	90
Idade	3(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério

Considerações posteriores:

24/04/2023	Pedido de Prorrogação de Certificado Aprovado na reunião extraordinária on-line do dia 24/04/2023. Validade: 06/08/2023 à 05/08/2025.
07/08/2018	Aprovado COM RECOMENDAÇÕES na reunião do dia 06/08/2018. Validade: 06/08/2018 à 05/08/2023 RECOMENDAÇÕES: 1. O pesquisador informou a origem dos animais no item 4.3 (acomodações). No entanto, a CEUA reforça que é importante que o biotério de origem dos animais seja indicado no item 3.8 (grupos de animais). 2. A CEUA informa que a linhagem de rato Wistar é heterogênica, e não isogênica, conforme

	informado no item 3.2. 3. A CEUA esclarece, para futuras submissões, que apesar da descrição do item 5 ser "Descrever todos os procedimentos que serão realizados nos grupos de animais, dieta, jejum, administração de drogas, dias de experimentação, etc." é importante que sejam descritos os procedimentos que serão realizados em cada grupo experimental. A descrição é importante para que a comissão consiga avaliar a necessidade do número de animais solicitados.
--	---

Belo Horizonte, 28/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br