

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CONSTRUTOS CRISPRa v2 VPR PARA SUPEREXPRESSION DO GENE COM POTENCIAL REGENERADOR EM NEURÔNIOS

CHEN, Y.^{#1}; PEREIRA, J. P. F.¹; DUBOIS, R. C.²; MONTEIRO, P. M. S.¹; SILVA, H. P.³; SILVA, T. F.¹; RIBAS, V. T.¹.

1 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

2 Pontifícia Universidade Católica, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

3 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

E-mail: yichen060705@gmail.com

A maioria dos neurônios maduros do sistema nervoso central de mamíferos é incapaz de se regenerar após lesões, o que representa um obstáculo significativo no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Nesse contexto, estratégias baseadas na modulação da expressão gênica têm emergido como uma alternativa promissora para restaurar funções neuronais comprometidas. Entre os genes envolvidos na diferenciação e manutenção neuronal, destaca-se o gene “A”, que codifica um fator de transcrição capaz de regular positiva ou negativamente a expressão de múltiplos genes. Durante o desenvolvimento, o gene “A” orienta a especificação de progenitores neurais e, em adultos, contribui para o funcionamento adequado dos neurônios. Evidências indicam que o aumento controlado da expressão endógena do gene “A” pode estimular processos regenerativos no sistema nervoso central, com menor risco de efeitos adversos por utilizar mecanismos naturais de regulação. Com base nessa hipótese, o presente projeto visa investigar o impacto da superexpressão endógena do gene “A” utilizando o sistema CRISPR ativador (CRISPRa v2 VPR). Foram desenhados cinco RNAs guias (gRNAs) direcionados a regiões distintas do promotor do gene, a fim de identificar os locais mais eficientes para ativação transcricional. Os construtos foram obtidos por clonagem molecular, inserindo cada gRNA em vetores contendo o sistema CRISPRa, e propagados em *E. coli* DH5 α . Após validação dos plasmídeos por digestão enzimática, os vetores foram encapsulados em nanopartículas lipídicas e transfectados em culturas primárias de neurônios corticais embrionários de rato (E18). A expressão do gene “A” foi quantificada por RT-qPCR. Dois dos cinco clones foram obtidos com sucesso, e desses, 1 apresentou aumento na expressão do gene “A”. Os demais gRNA ainda serão testados. Posteriormente, o clone mais eficiente será utilizado na geração de vetores rAAV, possibilitando análises *in vivo* e aplicações terapêuticas voltadas à regeneração neuronal.

Apoio Financeiro: FAPEMIG, FINEP

Palavras-chaves: Vetores virais; neuro regeneração; neurodegeneração; CRISPRa; Clonagem molecular.