

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM VETOR PARA SUPEREXPRESSION DO GENE “X” EM NEURÔNIOS MURINOS

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

1. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

2. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

3. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

*E-mail: joaopedropereiraf@gmail.com

O gene “X” codifica uma proteína massivamente expressa nos Neurônios Espinhosos Médios do estriado, que atua como um hub molecular no citoplasma, integrando sinais excitatórios de glutamato e os modulatórios de dopamina, sendo sua função estritamente ditada por seu estado de fosforilação. A neurodegeneração presente em doenças como Alzheimer, está associada à supressão da expressão do gene “X”. Nosso objetivo é superexpressar o gene “X” em neurônios corticais murinos, *in vitro*, para aumentar o reservatório total da proteína, elevando a probabilidade de fosforilação funcional, reforçando uma via neuroprotetora intrínseca e aumentando a resiliência neuronal. A modulação gênica é promovida pela entrega de uma plataforma de ativação CRISPRa, composto por uma proteína dCas9 cataliticamente inativa, fusionada a um complexo ativador e direcionada ao promotor do gene alvo por um RNA guia (gRNA). Cinco gRNAs foram desenhados para testar o melhor posicionamento da dCas9 no promotor do gene “X”. O plasmídeo de expressão foi construído via clonagem molecular. Atualmente, o projeto está na fase de validação *in vitro* da funcionalidade do vetor. Os plasmídeos foram encapsulados em nanopartículas lipídicas e transfectados em neurônios corticais embrionários de camundongo (E15) e células imortalizadas hipocâmpais de camundongo HT22. Após 5 dias, foi observado um aumento na expressão do gene “X” utilizando os gRNA 2 e 5, com o gRNA 5 mostrando o maior nível de ativação. Quando transfectado em células HT22 observou-se que o aumento da expressão gênica com 24h de administração, normalizando em 48h adiante. Esses resultados preliminares confirmam a funcionalidade do vetor. As próximas etapas incluem a confirmação do aumento da produção e estado de fosforilação da proteína, a produção de vetores virais rAAV para entrega tecido-específica e a avaliação da eficácia do tratamento em modelos *in vivo*.

Apoio financeiro: Finep, FAPEMIG, CNPq.

Palavras-chave: Vetores virais; terapia gênica; regulação gênica; superexpressão; CRISPR-dCas9.