

μ -tomografia de raios X aplicada ao estudo da regeneração axônica de zebrafish pós lesão medular

Orientadora: Hozana Andrade Castillo / LNBio

Introdução

Em humanos, a lesão medular é um evento devastante que tem um profundo impacto na qualidade de vida do paciente e traz efeitos econômicos e sociais abrangentes. No Brasil, a incidência de lesão medular é de cerca de 10 mil novos casos por ano (dados do Ministério da Saúde: Diretrizes de Atenção à pessoa com Lesão Medular, 2013), sendo que a incidência mundial é de 15 a 40 casos por milhão de habitante (dados da World Health Organization: International Perspectives on Spinal Cord Injury, 2013.). Existem vários programas de prevenção de acidentes e de reabilitação de pacientes que sofreram lesão medular, porém nenhum tratamento efetivo ou cura existem até o momento.

Em mamíferos, a lesão medular causa rompimento de axônios, morte neuronal e perda sensória e motora em segmentos posteriores à região afetada. Após a lesão, forma-se uma fibrose de origem glial que diminui a degeneração neuronal, mas também atua como uma barreira que impede axônios de atravessar o local da lesão e reconectar-se aos seus alvos. Muitos estudos mostram que camundongos tem certa capacidade de regeneração axônica após lesão parcial da medula espinhal, porém os mecanismos que controlam esse processo não são completamente conhecidos e resultados de diferentes grupos muitas vezes são controversos. Uma abordagem de potencial sucesso para entendermos os mecanismos moleculares que controlam a correta regeneração e reconexão axônica aos seus alvos é estudar como esse processo ocorre num organismo que possui alto potencial regenerativo. O zebrafish, tem elevada capacidade de regeneração de vários tecidos, incluindo a medula espinhal após lesão, um processo que é acompanhado por restauração tecidual e recuperação funcional (Goldshmit et al., 2012; Hui et al., 2010). Portanto, esse animal é um modelo ideal para estudar como a regeneração da medula espinhal ocorre naturalmente, entender o comportamento celular e as vias de sinalização que controlam diferentes os eventos envolvidos nesse processo. Uma vez que muitos dos programas genéticos e vias de sinalização são conservados em vertebrados (Goldshmit et al., 2014; Goldshmit et al., 2012; Shang et al., 2013), a descoberta dos mecanismos celulares e moleculares

responsáveis por uma resposta regenerativa robusta em zebrafish pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento e reparo da medula espinhal em mamíferos.

Regeneração axônica

O processo de regeneração da medula espinhal é concluído quando os axônios em regeneração, sejam eles de neurônios recém-formados ou de neurônios que estão acima e abaixo do local da lesão, conectam adequadamente aos seus alvos. Pouco se conhece sobre os mecanismos celulares e vias de sinalização que estão envolvidos neste processo. Ensaios de perda de função de diversos genes e microRNA foram realizados durante a regeneração de medula espinhal e vários deles, tais como *Tenascin-C*, *miR-133b*, *High mobility group box 1* (HMB1), *Major vault protein* (MVP), *Contactin-2* (TAG-1) e *L1.1* (homóloga à molécula de reconhecimento L1 de mamíferos) levaram a uma diminuição da regeneração axônica, mas o papel exato dessas moléculas neste processo ainda não é conhecido (Becker et al., 2004; Fang et al., 2014; Pan et al., 2012; Yu and Schachner, 2013; Yu et al., 2011a; Yu et al., 2011b). Apesar dos esforços anteriores para melhorar a regeneração axônica após lesão do Sistema Nervoso Central em mamíferos, nenhuma terapia bem-sucedida foi proposta até o momento. Dessa forma, compreender o comportamento celular dos motoneurônios e interneurônios durante a regeneração da medula espinhal em zebrafish, assim como as moléculas que controlam ou facilitam esse processo pode levar a descoberta de importantes candidatos terapêuticos que possam induzir neurônios de mamíferos a seguir os mesmos processos.

μ-tomografia de raios x por luz Síncrotron

O uso de técnicas de imageamento utilizando raios X em conjunto com algoritmos de tomografia computadorizada tem permitido a visualização e uma análise não destrutiva de estruturas internas dos mais diversos sistemas. Neste sentido, o desenvolvimento de uma instrumentação capaz de criar projeções de raios X com resolução micrométrica permitiu o que hoje é conhecido como μ-tomografia por raios x. Dentre esta instrumentação destaca-se os μ-tomógrafos que utilizam luz síncrotron, que além do fluxo elevado de fótons também podem explorar as diversas particularidades que a luz síncrotron possui (espectro contínuo, coerência da luz) dando-lhe grande versatilidade se comparada a fontes convencionais de raios X, dentre os quais desatacam-se o contraste por absorção elementar específico e/ou contraste de fase para amostras com baixa absorção.

Dentre as diversas estruturas que podem ser estudadas utilizando a técnica de μ -tomografia podemos destacar sistemas biológicos cuja histologia pode apresentar uma elevada complexidade estrutural tridimensional, mas também uma forte correlação entre forma e funcionalidade. Sendo assim a μ -tomografia de raios X por luz Sincrotron é uma poderosa ferramenta para análise não destrutiva da regeneração axônica e pode ser utilizada em animais adultos, nos quais os circuitos neuronais complexos já estão estabelecidos e as técnicas não destrutivas de microscopia de luz (incluindo confocal) não são aplicáveis, devido ao tamanho do animal e por não ser transparente. Porém para aplicar esta técnica no estudo da regeneração de zebrafish, é necessário o desenvolvimento de métodos de contraste específicos para raios x, capazes de revelar as células cujo comportamento celular se quer analisar: motoneurônios e interneurônios.

Tendo isso em foco, o objetivo deste projeto é analisar os mecanismos celulares envolvidos na regeneração axônica de zebrafish após lesão medular, utilizando μ -tomografia de raios X por luz Sincrotron. Mais especificamente, o desenvolvimento deste projeto envolverá a identificação de proteínas capazes de gerar o contraste necessário para identificação de estruturas biológicas específicas na linha de μ -tomografia de raios X do LNLS (atualmente linha IMX e futuras linhas Mogno e Carnaúba no Sírius). Em seguida essas proteínas serão engenheiradas para serem expressas sob o controle de um promotor gênico específico para motoneurônios ou interneurônios e zebrafish transgênicos serão gerados com essas construções. Estes animais expressarão as proteínas de contraste exclusivamente nas células cujo comportamento celular se quer analisar. Com isso teremos as ferramentas ideais para análise não destrutiva da regeneração axônica durante o processo de regeneração em zebrafish, utilizando μ -tomografia de raios X por luz Sincrotron. Essas análises nos permitirão não só identificar os mecanismos celulares que os motoneurônios e interneurônios empregam para a regeneração bem-sucedida da medula espinhal neste animal, mas também padronizar os métodos necessários para formação de imagens por microscopia de raios x (incluindo tomografia). Este projeto será desenvolvido em conjunto entre pesquisadores do LNBio e LNLS que trará grande integração entre os LNs, além do desenvolvimento de técnicas inovadoras que poderão ser disponibilizadas para a comunidade científica.

Objetivo Geral:

Analisar os mecanismos celulares envolvidos na regeneração axônica de zebrafish após lesão medular, utilizando μ -tomografia de raios X por luz Sincrotron.

Objetivos específicos:

- Identificar dentre as proteínas metalotioneína, APEX e minisog quais proporcionam o contraste necessário para identificação de estruturas biológicas na linha de μ -tomografia de raios X;
- Clonar as proteínas em questão em plasmídeos contendo braços de transposons, que facilitam a integração das sequências de interesse no genoma de zebrafish;
- Gerar animais geneticamente modificados que expressam a proteína de interesse sob controle do promotor do gene *Islet1* (expresso especificamente em motoneurônios) e/ou sob o controle do promotor do gene *vx2* (expresso especificamente em interneurônios 2);
- Realizar lesão medular em larvas de zebrafish geneticamente modificadas e analisar a regeneração axônica, utilizando μ -tomografia de raios X por luz Síncrotron.