

DNA SINTÉTICO PARA OTIMIZAÇÃO DE BIOMODELOS TRANSLACIONAIS USADOS EM ESTUDOS DE REGENERAÇÃO TECIDUAL

THALIA BECKER DE CANDIA¹; LEANDRO DA SILVA NUNES²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS²; MARIANA HÄRTER REMIÃO²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹ Universidade Federal de Pelotas – thaliaabecker123@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – leandro_donfa@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – luanafvreis@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – mh.remiao@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardíacas são a principal causa de morte no mundo, nos últimos 20 anos (WHO, 2020). Estas doenças estão aumentando devido aos maus hábitos da modernidade, como o tabagismo, a falta de exercícios físicos, dietas inadequadas e o consumo excessivo de álcool, que contribuem para fatores de risco como pressão alta, diabetes mellitus, obesidade e colesterol alto (MENDIS et al., 2011).

As doenças cardíacas causam danos no coração que não podem ser corretamente reparados devido a capacidade regenerativa limitada dos mamíferos (BERGMANN et al., 2015). Os peixes teleósteos, como *zebrafish* (*Danio rerio*) e *medaka* (*Oryzias latipes*), são animais que quando comparados com mamíferos adultos exibem capacidades proeminentes de regeneração cardíaca (LAI et al., 2017).

A capacidade de regeneração cardíaca do *zebrafish* resulta da ativação de programas morfogenéticos em resposta a lesões acarretando na proliferação dos cardiomiócitos preexistentes e remoção de tecido cicatricial e, conseqüentemente, restaurando a função cardíaca perfeitamente (CAO & POSS, 2018). Dentre os genes envolvidos nesses programas morfogenéticos, destacam-se os fatores de transcrição da família AP-1, que são prontamente expressos após a lesão cardíaca (BEISAW et al., 2020).

Fos1a é um gene da família AP-1 que se mostrou vital na proliferação e regeneração de cardiomiócitos de vertebrados (BEISAW et al., 2020). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que *fos1a* é um regulador mestre precoce durante a regeneração cardíaca de *zebrafish* sendo ativado no primeiro dia após a lesão, ativando uma cascata de outros genes importantes para o processo de reparo (NUNES et al., 2022). O silenciamento deste gene comprometeu drasticamente a proliferação de cardiomiócitos em rãs (*Xenopus tropicalis*) (WU et al., 2021). Além disso, o gene *fos1a* também foi evidenciado como fundamental na regeneração da nadadeira caudal de *zebrafish*, apresentando uma grande expressão após a amputação, sugerindo um papel regenerativo em diferentes tecidos (LEE et al., 2020).

Entretanto, *fos1*, o homólogo de *fos1a* em mamíferos, não é expresso na borda da ferida após o infarto do miocárdio em camundongos (*Mus musculus*) (VAN DUIJVENBODEN et al., 2019). Esta diferença de expressão entre *zebrafish* e camundongos poderia explicar a razão pela qual esta última espécie tem uma

capacidade regenerativa cardíaca tão limitada em relação a primeira (NUNES et al., 2022). Em concordância com isso, a superexpressão de *fosl1* em cardiomiócitos de ratos (*Rattus norvegicus*) *in vitro* gera fenótipos moleculares similares aos cardiomiócitos regenerativos de *zebrafish* (BEISAW et al., 2020).

Desta forma, o presente estudo apresenta a construção de uma molécula sintética de DNA recombinante que se refere a sua utilização para o aumento da expressão de *fosl1* em tecidos lesados de vertebrados, tais como peixes, mamíferos, anfíbios e aves. Tal construção visa aumentar a capacidade regenerativa destes animais, e conseqüentemente gerar um modelo translacional de regeneração tecidual para vertebrados.

2. METODOLOGIA

Para realizar este trabalho foram realizadas pesquisas em artigos para compreender as dinâmicas e o funcionamento do DNA sintético recombinante. Posteriormente, foi realizada uma busca de anterioridades nos bancos de patentes para garantir o princípio de originalidade da invenção usando termos de busca que descrevem aspectos da presente invenção (Tabela 1).

Para construção da molécula sintética de DNA recombinante, a sequência codificante do gene *FOSL1* humano com número de acesso no GenBank NM_005438.5 foi baixada do database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além disso, a sequência codificante da proteína repórter fluorescente *mTagBFP2* foi baixada do database SnapGene (<https://www.snapgene.com>). As sequências codificantes foram otimizadas para códons de *zebrafish* usando Codon Harmonizer (<http://biocatalysis.unigraz.at/sites/codonharmonizer.html>). As sequências também foram submetidas a mapeamento de restrição para a identificação de sítios para enzimas de restrição delas e realizou-se a remoção desses sítios através da substituição de bases.

Após a obtenção das sequências otimizadas, utilizou-se o software Ugene para construção da molécula sintética. A sequência otimizada de *FOSL1* foi ligada a *mTagBFP2* inserindo um peptídeo de auto-clivagem P2A entre elas. Também foi ligado operacionalmente um sinal de poliadenilação do SV40 para garantir a terminação da transcrição e adição de poliadeninas ao RNA mensageiro. A sequência da molécula sintética de DNA recombinante e suas aplicações para geração de modelos translacionais foi depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob o número de protocolo BR102022006108-4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado da busca de anterioridade, foram encontrados alguns trabalhos a partir da pesquisa utilizando as palavras chaves descritas, no entanto, nenhum destes se referia à mesma invenção aqui proposta. A Tabela 1 traz os números de trabalhos encontrados para cada banco de dados, de acordo com cada combinação de palavras-chave.

Tabela 1. Número de documentos encontrados em cada banco de dados pesquisado, de acordo com as combinações de palavras-chave.

Termos de busca	Resultado da Busca				
	INPI	USPTO	Google Patents	Espacenet	Portal Capes

FOSL1; zebrafish; regeneração; knockin	0	7	1	0	0
FRA-1; zebrafish; regeneração; knockin	0	0	168	0	0
FOSL1; zebrafish; regeneração; DNA sintético	0	1	85	0	0
FRA-1; zebrafish; regeneração; DNA sintético	0	0	398	0	0

A molécula sintética construída pode ser inserida dentro de um locus gênico endógeno de uma espécie de vertebrado. Desta forma, os mecanismos regulatórios do locus gênico controlarão a expressão do gene regenerativo *FOSL1* juntamente com seu repórter fluorescente para marcar o tecido. Como exemplo de aplicação, a molécula sintética pode ser inserida dentro do locus gênico da *inhbaa* de *zebrafish*, cujos mecanismos regulatórios são ativados em alguns tecidos após a lesão e, portanto, irá conferir uma expressão específica induzida pela lesão da molécula.

A molécula de DNA sintético dessa invenção deverá ser sintetizada quimicamente por uma empresa de síntese de genes, como GenScript, IDT e Twist Bioscience, e poderá ser inserida em um vetor sintetizado próprio ou comercial, de empresas da área, tais como, Addgene, ThermoFisher, NEB, GenScript, IDT e Twist Bioscience.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a presente inovação da construção de uma molécula sintética de DNA recombinante possa ser introduzida em um locus gênico do genoma de uma espécie de vertebrado modelo, como *zebrafish*, para regulação dessa molécula num contexto específico de lesão tecidual. Os modelos translacionais gerados a partir desta inovação trarão grande contribuição no estudo de regeneração tecidual, uma vez que auxiliarão na compreensão das vias genéticas, e conseqüentemente, vias metabólicas envolvidas neste processo. Não somente a cardiologia, mas também a neurologia, a dermatologia, dentre outras áreas, podem vir a serem beneficiadas com a presente invenção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEISAW, A.; KUENNE, C.; GUENTHER, S.; DALLMANN, J.; WU, C.C.; M. BENTSEN, M.; LOOSO, M.; STAINIER, D.Y.R. AP-1 Contributes to Chromatin Accessibility to Promote Sarcomere Disassembly and Cardiomyocyte Protrusion during Zebrafish Heart Regeneration. **Circulation Research**, USA, v. 126, n. 12, p.1760-1778, 2020.

BERGMANN, O.; ZDUNEK, S.; FELKER, A.; SALEHPOUR, M.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SJOSTROM, S.L.; SZEWCZYKOWSKA, M.; JACKOWSKA, T.; REMEDIOS, C.; MALM, T.; ANDRÄ, M.; JASHARI, R.; NYENGAARD, J.R.; POSSNERT, G.; JOVINGE, S.; DRUID, H.; FRISÉN, J. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. **Cell**, USA, v. 161, n. 7, p. 1566-1575, 2015.

CAO, J.; POSS, K.D. The epicardium as a hub for heart regeneration. **Nature Reviews Cardiology**, New York, v. 15, n. 10, p. 631-647, 2018.

LAI, S.L.; MARÍN-JUEZ, R.; MOURA, P.L.; KUENNE, C.; LAI, J.K.H.; TSEDEKE, A.T.; GUENTHER, S.; LOOSO, M.; STAINIER, D.Y.R. Reciprocal analyses in zebrafish and

medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. **Elife**, Cambridge, v. 6, n. e25605, 2017.

LEE, H.J.; HOU, Y.; CHEN, Y.; DAILEY, Z.Z.; RIDDIHOUGH, A.; JANG, H.S.; WANG, T.; JOHNSON, S.L. Regenerating zebrafish fin epigenome is characterized by stable lineage-specific DNA methylation and dynamic chromatin accessibility. **Genome Biology**, UK, v. 21, n. 1, p. 1-17, 2020.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B.; WORLD HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEART FEDERATION; WORLD STROKE ORGANIZATION. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2011.

NUNES, L.S.; DOMINGUES, W.B.; KREMER, F.S.; PINHAL, D.; CAMPOS, V.F. Reconstruction of regulatory network predicts transcription factors driving the dynamics of zebrafish heart regeneration. **Gene**, Netherlands, v. 819, p. 1-9, 2022.

VAN DUIJVENBODEN, K.; BAKKER, D.E.M.; MAN, J.C.K.; JANSSEN, R.; GÜNTHEL, M.; HILL, M.C.; HOOIJKAAS, I.B.; VAN DER MADE, I.; VAN DER KRAAK, P.H.; VINK, A.; CREEMERS, E.E.; MARTIN, J.F.; BARNETT, P.; BAKKERS, J.; CHRISTOFFELS, V.M. Conserved NPPB+ Border Zone Switches from MEF2- to AP-1-Driven Gene Program. **Circulation**, USA, v. 140, n. 10, p. 864-879, 2019.

WHO. **The top 10 causes of death**. WHO, Geneva, 9 dec. 2020. Acessado em 21 sep. 2023. Online. Disponível em:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

WU, H.Y.; ZHOU, Y.M.; LIAO, Z.Q.; ZHONG, J.W.; LIU, Y.B.; ZHAO, H.; LIANG, C.Q.; HUANG, R.J.; PARK, K.S.; FENG, S.S.; ZHENG, L.; CAI, D.Q.; QI, X.F. Fosl1 is vital to heart regeneration upon apex resection in adult *Xenopus tropicalis*. **npj Regenerative Medicine**, UK, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2021.