

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Giovanna Boscolo Castilho Gonçalves
Vitor Alcantara Rossi

**A UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA CORREÇÃO DA
ALTERAÇÃO GENÉTICA EM INDIVÍDUOS COM ATAXIA DE FRIEDREICH**

São Paulo
2023

Giovanna Boscolo Castilho Gonçalves – RA: 015140

Vitor Alcantara Rossi – RA: 017664

**A UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA A CORREÇÃO DA
ALTERAÇÃO GENÉTICA EM INDIVÍDUOS COM ATAXIA DE FRIEDREICH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Gonçalves, Giovanna Boscolo Castilho

A utilização de processos biotecnológicos para correção da alteração genética em indivíduos com ataxia de Friedreich / Giovanna Boscolo Castilho Gonçalves, Vitor Alcantara Rossi. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

58 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Ataxia de Friedreich 2. Edição de genes 3. Herpesvirus humano 1 4. Proteína 9 associada à CRISPR 5. Terapia genética I. Rossi, Vitor Alcantara II. Lima, Fabio Mitsuo III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 573.21

AGRADECIMENTOS

É com grande emoção que expressamos nossos sinceros agradecimentos a todos que tornaram possível a conclusão deste trabalho de conclusão de curso. Cada passo ao longo deste caminho foi marcado por apoio e dedicação, e nós não poderíamos ter chegado até aqui sem a ajuda e o encorajamento de muitas pessoas especiais.

Primeiramente, eu, Vitor, quero expressar minha profunda gratidão à minha família, Nivia Rossi, Sylvio Rossi, Julia Rossi e Guilherme Rossi. Vocês sempre foram minha base, meu apoio inabalável, e a fonte infinita de amor e incentivo. Sem a compreensão e paciência de vocês, esta jornada teria sido muito mais difícil.

À minha incrível rede de amigos que fiz no decorrer do curso, Giovanna Boscolo, Caroline Chiovatto, Beatriz Gatto, Ana Carolina e muitos mais, que me apoiaram nos momentos bons e ruins, e compartilharam suas experiências e conhecimentos. Vocês foram meu porto seguro quando eu precisava de um descanso e minha fonte de inspiração quando eu me sentia desafiado.

Além disso, não posso deixar de reconhecer a equipe do estágio da Art Medicina Reprodutiva por me acolher calorosamente e proporcionar uma experiência valiosa durante meu período de estágio. Agradeço aos meus colegas de trabalho, Carolina Tomazinho e Giovana Bresciani por compartilharem seus conhecimentos e experiências no campo, tornando meu estágio na área da reprodução uma oportunidade de aprendizado prática e enriquecedora.

Dando continuidade aos agradecimentos pessoais, eu, Giovanna, agradeço profundamente o apoio e o incentivo vindo das pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Andrea Eliza Boscolo e Renato Castilho Goncalves. Vocês são minha eterna inspiração e a fonte maior da minha força.

Ao meu namorado, que mais que um parceiro de vida é um exemplo em todos os parâmetros, Diego Wittner, e aos meus familiares que foram grandes incentivadores desse processo. Agradeço também as forças maiores que permitiram e me deram força de enfrentamento para esse importante fechamento de ciclo.

Além disso, não posso deixar de agradecer ao meu parceiro de TCC, Vitor Rossi, e a todos os amigos que me ajudaram a percorrer o caminho incerto da graduação, vocês foram mais que importantes.

Por fim, agradeço imensamente a AFIP - Medicina Diagnóstica por todo o acolhimento maravilhoso e grandes ensinamentos e ao Comitê Paralímpico Brasileiro por me apresentar pessoas incríveis e um mundo novo de possibilidades.

Nós agradecemos ao Centro Universitário São Camilo, pela oportunidade de aprender e crescer ao longo destes anos. Aos nossos professores e colegas de classe por compartilharem seus conhecimentos e experiências, o que enriqueceu nosso aprendizado e ampliou nossa visão de mundo.

Não podemos deixar de mencionar a dedicação e orientação do corpo docente desta instituição. Em especial, gostaríamos de agradecer ao nosso orientador Fábio Mitsuo, que nos guiou no desenvolvimento do trabalho com paciência e expertise, ajudando a aprimorar nossas habilidades de pesquisa e a desenvolver este TCC de forma significativa.

Por fim, gostaríamos de expressar nossa gratidão a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental nesta jornada e somos profundamente gratos.

Este TCC é o resultado do esforço coletivo de muitas pessoas incríveis, e nós não poderíamos estar mais orgulhosos do que conseguimos realizar juntos. Obrigado do fundo do nosso coração por fazerem parte deste capítulo importante da nossa vida.

Com gratidão,

Vitor Rossi e Giovanna Boscolo

RESUMO

A ataxia de Friedreich é uma doença neurodegenerativa rara causada por uma mutação genética no gene FXN que afeta o processo de transcrição e tradução da proteína frataxina. Doenças causadas por uma alteração monogênica são fortes candidatas para o uso da terapia gênica como correção genética. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi analisar e discutir as informações mais recentes sobre os processos biotecnológicos capazes de corrigir tal mutação. Foi abordada a tecnologia de terapia gênica por meio do uso de vetores virais, da utilização do sistema CRISPR-Cas9 e também do uso de aptâmeros. Para isso, foi utilizado como método a revisão bibliográfica narrativa com base em artigos publicados nas bases de dados Pubmed, Scielo e Google Scholar. Foi visto que em ambas as pesquisas abordadas foram apresentados resultados significativos na correção da expansão gênica e na desaceleração da neurodegeneração causada pela doença, demonstrando uma perspectiva positiva em relação a utilização de processos biotecnológicos para a correção da alteração genética em indivíduos com ataxia de Friedreich.

Palavras-chave: Ataxia de Friedreich, Frataxina, Edição Genética, Terapia Gênica, CRISPR-Cas9, Vetor HSV-1 amplicon, DT-216, Aptâmeros.

ABSTRACT

Friedreich's ataxia is a rare neurodegenerative disease caused by a genetic mutation in the FXN gene, affecting the process of transcription and translation of the frataxin protein. Diseases caused by a monogenic alteration are good candidates for gene therapy as a genetic correction method. Based on this, the aim of this study was to analyze and discuss the most recent information on biotechnological processes capable of correcting such a mutation. Gene therapy technology was addressed through the use of viral vectors, the CRISPR-Cas9 system, and the use of aptamers. To achieve this, we employed a narrative literature review method based on articles published in the Pubmed, Scielo, and Google Scholar databases. It was observed that in both approaches discussed, significant results were presented in correcting the gene expansion and slowing down the neurodegeneration caused by the disease, demonstrating a positive outlook regarding the use of biotechnological processes for correcting the genetic alteration in individuals with Friedreich's ataxia.

Keywords: Friedreich's Ataxia, Frataxin, Genetic Editing, Gene Therapy, CRISPR-Cas9, HSV-1 amplicon vector, DT-216, Aptamers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FXN	Frataxina
FRDA	Ataxia de Friedreich
RNA-ett	Ácido ribonucleico não codificante
iPSCs	Células Tronco Pluripotentes Induzidas
ATP	Adenosina tri-fosfato
mFARS	Escala de Classificação de Ataxia de Friedreich modificada
SARA	Escala de Avaliação e Classificação de Ataxia
ICARS	Escala de Avaliação de Ataxia Cooperativa Internacional
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
CoQ 10	Coenzima Q 10
MLV	Virus da Leucemia Murinia
R-PAS	Revista Pan-Amazônica de Saúde
AAV	Virus Adeno-associado
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas
sgRNA	RNA guia
tracrRNA	RNA trans ativador
DSB	Quebra de dupla-fita
NHEJ	Junção de extremidades não-homologas
HDR	Reparo dirigido por homologia

SELEX	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial
HSV-1	Virus da Herpes
pHLC	Vetor com amplicon de CRE recombinase
pHF	Vetor com amplicon de frataxina humana
HSPC	Transplante singênico de células-tronco hematopoiéticas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
3. METODOLOGIA	14
4. DESENVOLVIMENTO	15
4.1. ATAXIA DE FRIEDREICH.....	15
4.1.1. Histórico de descoberta da doença.....	15
4.1.2. Alteração genética.....	16
4.1.3. Disfunções e alterações celulares.....	18
4.1.4. Patologia Clínica.....	19
4.1.5. Diagnóstico.....	22
4.1.6. Tratamentos atuais.....	24
4.2. MÉTODOS DE CORREÇÃO GÊNICA.....	26
4.2.1. Transferência gênica através de vetor viral.....	26
4.2.1.1. Descoberta.....	26
4.2.1.2. Metodologia.....	27
4.2.1.3. Uso aplicado à medicina e engenharia genética.....	28
4.2.2. CRISPR - Cas9.....	30
4.2.2.1. Descoberta.....	30
4.2.2.2. Metodologia.....	31
4.2.2.3. Uso aplicado à medicina e engenharia genética.....	33
4.2.3. Aptâmeros.....	34
4.2.3.1. Descoberta.....	34
4.2.3.2. Metodologia.....	35
4.2.3.3. Uso aplicado à medicina e engenharia genética.....	35
4.3. MÉTODOS DE CORREÇÃO GÊNICA APLICADO A ATAXIA DE FRIEDREICH.....	37
4.3.1. Vetor HSV-1 amplicon (Viral).....	37
4.3.2. CRISPR-Cas9 em células tronco hematopoiéticas.....	40
4.3.3. Aptâmeros (DT-216).....	44
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A Ataxia de Friedreich (FRDA) é uma doença pouco comum, tendo sua frequência de 0,000568% da população e sua incidência de 1/22.000 a 2/100.000 nascidos vivos (CHAWLA, 2021). Estima-se que, no Brasil, cerca de 850 pessoas podem ser portadoras da doença. Oficialmente, o país é o segundo com mais pacientes em todo o mundo, somente atrás dos Estados Unidos (“Ataxia de Friedreich: estudo revela novos insights sobre patogênese da doença | CEPID BRAINN”, 2023).

Por conta da sua baixa incidência, a FRDA foi adicionada ao rol das doenças raras. Considera-se doença rara aquela que afeta até 65 pessoas em cada 100.000 indivíduos, sendo aproximadamente, 1,3 pessoas para cada 2.000 indivíduos. É estimado que existam cerca de 6.000 a 8.000 tipos de doenças raras no mundo, sendo 80% causadas por fatores genéticos. Por alcançarem um percentual significativo da população, são consideradas um problema de saúde relevante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Esta é uma doença neurodegenerativa rara, sendo uma condição autossômica recessiva, desenvolvida através de uma mutação genética que leva a uma expansão homozigótica da repetição do trinucleotídeo guanina-adenina-adenina (GAA) no íntron 1 do gene da frataxina no cromossomo 9q13, causando uma deficiência transcricional do mesmo (KOEPPEN, 2011).

A deficiência na transcrição deste gene, leva a uma diminuição na disponibilidade da proteína frataxina nas células. Essa proteína está localizada na matriz mitocondrial e sua presença é fundamental para o funcionamento adequado da mitocôndria, sendo amplamente aceito que o fenótipo clínico e patológico associados à doença são causados pela deficiência de frataxina (GONZÁLEZ-CABO; PALAU, 2013).

As opções terapêuticas atuais para a Ataxia de Friedreich são dadas por meio de intervenções farmacológicas que se baseiam em melhorar a função mitocondrial e aumentar a expressão de frataxina, mas essas não são eficazes na diminuição e prevenção da neurodegeneração em ensaios clínicos (SIVAKUMAR; CHERQUI, 2022).

Uma abordagem promissora para a FRDA consiste na engenharia genética focada na edição de genes, que permite por meio do uso de nucleases alvo específicas a manipulação gênica. Atualmente, diversas nucleases são amplamente estudadas, sendo uma delas as nucleases Cas9 associadas a repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas (CRISPR-Cas9) (SIVAKUMAR; CHERQUI, 2022).

Visto que, atualmente, não existe um tratamento efetivo para essa doença, e que a terapia gênica seria uma abordagem terapêutica plausível e promissora (DÍAZNILDO et al, 2021), desenvolvemos uma revisão bibliográfica sobre o assunto, buscando abordar os processos biotecnológicos em estudo para FRDA, como a terapia gênica por meio do uso de vetor viral, a edição gênica por meio da utilização de CRISPR-Cas9 e o uso de aptâmeros.

2. OBJETIVO

Realizar levantamento bibliográfico em bases de dados e bibliotecas científicas, sintetizando, analisando e discutindo as informações mais recentes sobre os processos biotecnológicos capazes de minimizar ou corrigir os efeitos da expansão homocigótica que leva ao desenvolvimento da Ataxia de Friedreich. Buscando reunir informações de amplo aspecto sobre a patologia e sobre os métodos genéticos abordados.

3. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa a partir de artigos publicados em português e em inglês, entre 1863 e 2023, encontrados nas bases de dados Pubmed, Scielo e Google Scholar.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1. ATAXIA DE FRIEDREICH

4.1.1. Histórico de descoberta da doença

Em 1863, Nikolaus Friedreich, patologista e neurologista alemão, identificou e relatou o fenótipo observado em indivíduos com FRDA pela primeira vez e, por conta disso, a doença posteriormente levou seu nome (FRIEDREICH, 1863). Entre 1863 e 1877, Nikolaus publicou vários artigos descrevendo a FRDA. Em suas publicações ele reconheceu que a doença era hereditária e teve uma vasta compreensão de sua patogênese, relatando a atrofia e identificando lesões no coração e na medula espinhal (KOEPPEN, 2011).

Em 1907, Frederick Walker Mott, neuropatologista nascido na Grã-Bretanha, publicou uma descrição detalhada de um único caso de FRDA, citando pela primeira vez a lesão no núcleo denteado, localizado no cerebelo (KOEPPEN, 2011).

Depois das descobertas clínicas e dos relatos de casos publicados, diversas pesquisas foram iniciadas em busca da causa raiz da doença. Um grande avanço foi realizado, em 1980, quando Lamarche e seus colegas descobriram a presença de grânulos de ferro nos cardiomiócitos de pacientes com FRDA (LAMARCHE *et al.*, 1980).

Já em 1996, uma informação imprescindível foi trazida à tona por Campuzano e seus colegas. Eles identificaram a mutação responsável pela causa da FRDA. Além disso, nomearam a proteína que estava em baixas quantidades em indivíduos com a doença, a frataxina, e reconheceram seu papel no metabolismo do ferro (CAMPUZANO *et al.*, 1996).

Após ser identificada a alteração genética responsável pela FRDA e, ser descoberto o envolvimento da frataxina (FXN) com o metabolismo do ferro, as pesquisas se voltaram para descobrir a estrutura e função da proteína no meio celular. Assim, em 2002, Muhlenhoff e seus colegas fizeram um experimento utilizando um homólogo da frataxina proveniente de leveduras e conseguiram

identificar a sua importância na biogênese de aglomerados de ferro-enxofre (Fe-S) (MUHLENHOFF, 2002).

Com o avanço das pesquisas sobre a estrutura da frataxina, os enfoques principais das pesquisas passaram a ser: o metabolismo do ferro, uma vez que ainda há muitas questões em aberto a respeito desse tema, o processo de desintoxicação de ferro, buscando uma correção do mesmo e terapias gênicas, visando curar a síndrome genética (KOEPPEN, 2011).

4.1.2. Alteração genética

A mutação responsável pela maioria dos casos de FRDA é uma expansão homozigótica da repetição do trinucleotídeo guanina-adenina-adenina (GAA) no primeiro intron não codificante do gene FXN, localizado no cromossomo 9q13. Alguns casos, aproximadamente de 1 a 3 %, estão associados com uma expansão heterozigótica composta com uma mutação pontual ou deleção (KOEPPEN, 2011).

A expansão intrônica do GAA, até aproximadamente 40 repetições, é encontrada em cromossomos normais, e o limiar patológico é de aproximadamente 70 repetições. Indivíduos portadores de FRDA possuem normalmente a expansão com 600 a 900 repetições e o comprimento dessa expansão se correlaciona com a idade de início dos sintomas e com a gravidade da doença (KOEPPEN, 2011).

Essa alteração genética quando presente nos dois alelos causa uma regulação negativa da transcrição do gene FXN, o que resulta na deficiência de frataxina, uma pequena proteína de 210 aminoácidos e 23 kDa. A regulação negativa ocorre devido ao término precoce da transcrição, levando à formação de um novo RNA truncado e estável. Esse transcrito, denominado de RNA-ett, sofre splicing alternativo não produtivo e não contribui no processo da síntese da frataxina funcional. O nível do RNA-ett se correlaciona diretamente com o tamanho da expansão intrônica. (YANJIE LI *et al*, 2022).

Em um estudo abordando 221 pacientes, aproximadamente 96% dos casos eram homozigotos para a expansão repetida do trinucleotídeo GAA no primeiro íntron do gene FXN. Estes apresentavam a proteína frataxina sem nenhuma mutação. Os 4% restantes, eram heterozigotos compostos para a expansão do GAA e

apresentavam uma mutação pontual na proteína frataxina. Assim, na grande maioria dos casos a causa do distúrbio multissistêmico não se dá por meio da tradução de uma proteína mutada e sim, da diminuição acentuada dos níveis de proteína funcional, a frataxina (COSSÉE M *et al*, 1999).

Apesar de ter sido descrita, em 1996, a interrupção prematura da transcrição do gene FXN, os mecanismos diretos desse processo ainda são desconhecidos (YANJIE LI *et al*, 2022).

Segundo o artigo experimental denominado “Premature transcription termination at the expanded GAA repeats and aberrant alternative polyadenylation contributes to the *Frataxin* transcriptional deficit in Friedreich’s ataxia”, várias hipóteses de desvio do funcionamento fisiológico foram testadas (YANJIE LI *et al*, 2022).

Foi constatado no artigo indicado acima, que o recrutamento da RNA polimerase II para o promotor FXN não é afetado nas células FRDA. Para isso, foi realizado um experimento utilizando células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), divididas em um grupo de controle e um grupo afetado pela FRDA - com expansão confirmada do GAA de aproximadamente 600 repetições e, também um anticorpo específico para a Pol II total, seguido da técnica de sequenciamento de nova geração. A análise do sequenciamento revelou uma ocupação semelhante da região promotora do gene *FXN* por Pol II em células do grupo de controle e do grupo afetado por FRDA, indicando que o recrutamento da maquinaria de transcrição para a região promotora *FXN* não é afetado na FRDA (YANJIE LI *et al*, 2022).

Também foi comprovado a partir deste experimento que, a expansão do GAA em células com FRDA afetam a transição da iniciação para o alongamento produtivo, induzindo o término aberrante da transcrição. O término precoce foi confirmado pela análise dos resultados do sequenciamento de nova geração, que indicou um acúmulo de RNA, denominado de RNA-ett, nas células afetadas por FRDA quando comparadas ao controle (YANJIE LI *et al*, 2022).

4.1.3. Disfunções e alterações celulares

A proteína denominada frataxina está localizada na matriz mitocondrial em associação com a membrana mitocondrial interna. As funções mitocondriais são de demasiada importância em todas as células, mas são especialmente importantes no sistema nervoso, sendo essenciais para o desenvolvimento e manutenção neuronal (GONZÁLEZ-CABO; PALAU, 2013).

As mitocôndrias são organelas vitais com características morfológicas distintas. A rede dinâmica de mitocôndrias sofre alterações estruturais e funcionais de acordo com a demanda metabólica de cada tecido. Mesmo no interior da mesma célula, as mitocôndrias podem formar subpopulações funcionalmente diferenciadas. Essa heterogeneidade é de extrema importância nas células polarizadas, como os neurônios, onde a carga metabólica e a complexidade de funcionamento da célula requer mitocôndrias precisamente localizadas e capazes de realizar funções subcelulares únicas (PEKKURNAZ; WANG, 2022).

A função neuronal depende do fornecimento de energia. Para isso, o oxigênio e a glicose contidos no sangue são convertidos em ATP através de processos que ocorrem no interior da mitocôndria. A longo prazo, a produção de ATP nos neurônios é gerado pela oxidação completa da glicose, seguida pela fosforilação oxidativa. No curto prazo, pela glicólise (HALL *et al.*, 2012).

Após o gene que codifica a proteína frataxina (FXN) ser relacionado com a FRDA, diversas pesquisas foram iniciadas em busca de respostas a respeito de sua estrutura e função celular. A frataxina é uma pequena proteína ácida, com ponto isoelétrico em torno de 4,9, altamente conservada nos organismos, desde bactérias até mamíferos (PASTORE; PUCCIO, 2013).

Depois de diversos estudos com marcadores, é aceito que a frataxina é codificada no interior do núcleo, é expressa no citoplasma e é importada para a mitocôndria através de um sinal de importação contido no N-terminal (PASTORE; PUCCIO, 2013).

A diminuição da quantidade de frataxina expressa leva à desregulação da homeostase do ferro mitocondrial e ao conseqüente dano oxidativo, que é o responsável pela morte neuronal (ADINOLFI S *et al.*, 2002).

Há evidências de que a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial, o dano oxidativo e o acúmulo de ferro são fatores imprescindíveis no mecanismo da doença. Ainda não está totalmente identificada a função da frataxina, mas pelo pesquisado acreditam que ela esteja envolvida no manuseio do ferro mitocondrial, na regulação de antioxidantes e/ou na regulação do centro de ferro e enxofre (COOPER:SCHAPIRA, 2007).

Um estudo denominado “Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis”, caracterizou a ferropoptose como sendo uma forma recém-descoberta de morte celular não apoptótica, que apresenta peroxidação lipídica dependente de ferro. Porém, o mecanismo molecular preciso desse processo ainda é desconhecido (JING DU *et al.*,2020).

Esse mesmo estudo conseguiu identificar a proteína frataxina (FXN) como sendo um regulador chave da ferroptose, que atua modulando a homeostase do ferro e a função mitocondrial (JING DU *et al.*,2020).

No estudo foi feito um experimento que envolveu a cultura de células de fibrossarcoma humano HT-1080 e a utilização de anticorpos marcados para diversos alvos avaliados (JING DU *et al.*,2020).

Com isso, foi visto que a supressão da expressão de FXN reprimiu a proliferação celular. Além de destruir a morfologia mitocondrial, impedir a montagem do cluster Fe-S e ativar o estresse causado pelo consequente acúmulo de ferro livre. Essa diminuição da expressão de frataxina aumentou significativamente a morte celular induzida por erastina, gerando danos morfológicos mitocondriais como a fragmentação aumentada e cristas desaparecidas (JING DU *et al.*,2020).

4.1.4. Patologia Clínica

Os sinais e sintomas decorrentes da FRDA aparecem geralmente em torno da puberdade. Um estudo envolvendo 80 portadores da doença, indicou dois picos como sendo a idade modal de início dos sintomas entre 6 e 9 anos e entre 12 e 15 anos (FILLA *et al.*, 1990). Um outro estudo envolvendo 115 portadores da doença, indicou a idade modal de início dos sintomas com a média de 10,52 anos (HARDING, 1981).

Nicholas Friedreich, em seu estudo de caso que identificou primeiramente a doença, descreveu patologicamente seis pacientes com atrofia degenerativa dos gânglios posteriores da medula. Clinicamente, eles foram descritos com equilíbrio deficiente, fraqueza nas pernas, diminuição na capacidade de marcha, coordenação prejudicada, disartria, nistagmo, sensação prejudicada, cifoescoliose e deformidades nos pés. Também foi observado a degeneração gordurosa do coração em três dos casos (FRIEDREICH, 1863).

De acordo com Harding, os primeiros sintomas identificados nos pacientes foram: a ataxia dos membros e do tronco e a ausência de reflexos tendinosos nas pernas. Também segundo ele, durante os 5 primeiros anos do aparecimento dos sintomas é identificada a disartria, dificuldade em articular palavras corretamente e, pode se fazer presente os sinais de disfunção do trato piramidal nas pernas e perda da posição articular e sensação de vibração. A escoliose e a cardiomiopatia foram encontradas em mais de dois terços dos pacientes estudados e cerca de 10 por cento dos pacientes tinham diabetes mellitus, que foi controlada por hipoglicemiantes orais em um quarto (HARDING, 1981).

O fenótipo observado em pacientes com FRDA, em que a ataxia de tronco e de membros, a disartria e a fraqueza muscular estão quase sempre presentes, resulta da degeneração espinocerebelar, da neuropatia sensorial periférica e do funcionamento inadequado do nervo vestibular (DELATYCKI: CORBEN, 2012).

A ataxia é de longe o sintoma de apresentação mais comum na ataxia de Friedreich. Com ela, a marcha torna-se instável com quedas crescentes e caminhar em terreno irregular ou com pouca luz torna-se difícil. Posteriormente, a dificuldade em ficar em pé se faz presente. Muitos pacientes relatam uma história antecedente de falta de jeito e a incapacidade de participar de esportes (PARKINSON *et al.*, 2013).

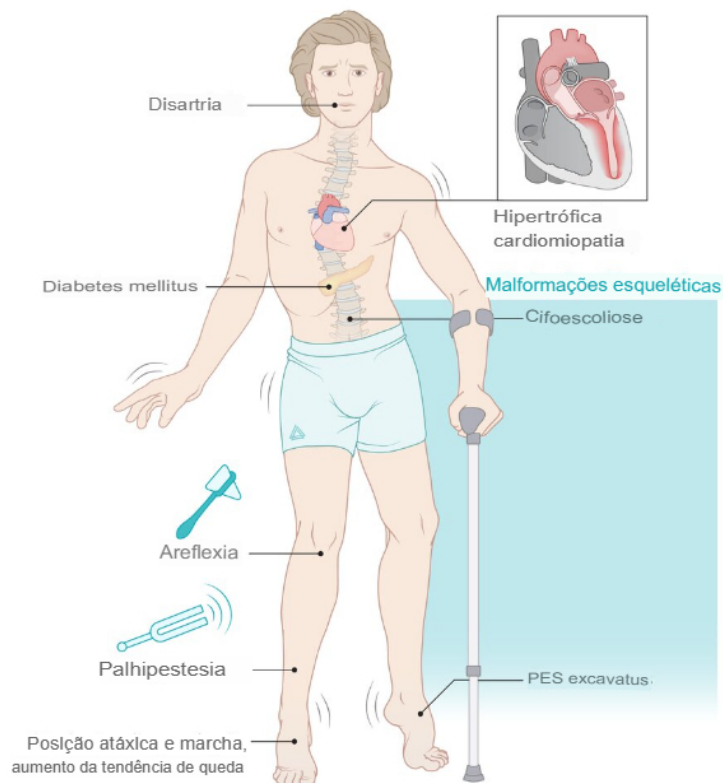
Há uma crescente dependência de auxílios para caminhar, inicialmente de móveis, paredes e outras pessoas e, posteriormente de bengalas, andadores e cadeira de rodas (PARKINSON *et al.*, 2013). Harding, em seu estudo já citado neste trabalho, descobriu que o intervalo de tempo entre o início dos sintomas até a dependência da cadeira de rodas é de aproximadamente 15,5 anos (HARDING, 1981).

A disartria também é um sinal comum e precoce presente em mais de 90% dos indivíduos, em que o comprometimento na fala progride com o avanço da doença. A disfagia, dificuldade com deglutição, é mais um sintoma comum e pode se tornar problemático com o avanço da doença (PARKINSON *et al.*, 2013).

A evidência de complicações cardíacas é encontrada se procurada na maioria dos casos de FRDA, embora os pacientes muitas vezes sejam assintomáticos. Uma das alterações cardíacas mais encontradas em indivíduos com FRDA é a cardiomiopatia hipertrófica, sendo visível principalmente hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (ACKROYD, 1984).

Um estudo transversal retrospectivo foi realizado por Schadt e seus colegas, em 2012, revisando ecocardiogramas de 239 indivíduos de idade variada portadores de FRDA e indicou alterações em 90% dos indivíduos. Os achados incluíam alterações inespecíficas da onda ST-T (53%), eixo direito desvio (32%), hipertrofia ventricular esquerda (19%) e hipertrofia ventricular direita (13%). O sexo feminino e comprimentos de repetição de GAA mais curtos foram associados a um ECG normal. Já o sexo masculino e os de idade mais jovem eram mais propensos a apresentar hipertrofia ventricular (SCHADT *et al.*, 2012)

Falando sobre anormalidades esqueléticas, um estudo que envolvia 56 pacientes com FRDA levantou dados sobre a incidência de alterações na coluna vertebral. A escoliose de mais de 10 graus em 100% dos pacientes e hipercifose em 66%. A maioria dos casos apresentava curvas torácica e lombar duplas (LABELLE, 1986).



Fonte: Adaptado de “Friedreich ataxia - Knowledge @ AMBOSS”, [s.d.].

Visando acompanhar a progressão dos sintomas e da doença em si, escalas de classificação clínica foram desenvolvidas e padronizadas em um exame neurológico codificado. Estas são: a Escala de Classificação de Ataxia de Friedreich modificada (mFARS), a Escala de Avaliação e Classificação de Ataxia (SARA) e a Escala de Avaliação de Ataxia Cooperativa Internacional (ICARS). A SARA possui somente 8 itens e 4 bilaterais, enfatizando uma avaliação rápida em consultas periódicas. Já as outras escalas, por serem mais demoradas e complexas, são normalmente utilizadas em pesquisas de coleta de dados (RUMMEY *et al.*, 2022).

4.1.5. Diagnóstico

Anteriormente, quando não se conhecia a alteração genética presente em indivíduos portadores de FRDA, a doença era diagnosticada através de testes clínicos aplicados por médicos (DELATYCKI: CORBEN, 2012).

A primeira tentativa de definir critérios diagnósticos foi feita por Geoffroy e colegas, sugerindo que os critérios primários, que deveriam estar presentes no paciente para o mesmo ser diagnosticado com FRDA, eram: o início dos sintomas antes dos 20 anos, a ataxia da marcha, a disartria, a perda de posição articular e sensação de vibração, a ausência de reflexos tendinosos nas pernas e a presença de fraqueza muscular. Os critérios secundários, que podem ou não estar presentes, eram: a cardiomiopatia, a escoliose, o pé cavo e respostas plantares extensoras (GEOFFROY *et al.*, 1976).

Posteriormente, em 1981, Harding propôs critérios menos rigorosos, buscando diagnosticar os casos que por algum motivo não apresentavam algum sintoma citado como primário em 1976. Em sua definição, os critérios primários eram: início dos sintomas antes dos 25 anos, ataxia de membros e marcha e a ausência de reflexos tendinosos nos joelhos e tornozelos. Os critérios secundários eram: a respostas plantares extensoras e a disartria (HARDING, 1981).

Em 1996, com a descoberta da alteração genética causadora de FRDA, esses critérios citados acima mostraram-se específicos, mas não particularmente sensíveis, com cerca de 25% dos indivíduos afetados pela alteração não preenchendo esses critérios (DELATYCKI: CORBEN, 2012).

Atualmente, são utilizados dois meios de diagnóstico molecular. O primeiro deles é a pesquisa de expansão de trinucleotídeos GAA no íntron 1 do gene FXN por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em gel de agarose ou por eletroforese capilar. Esse exame é a primeira escolha dos médicos, visto que ele detecta aproximadamente 96% dos casos, aqueles que apresentam a expansão homozigótica do GAA (GENOMIKA, 2020).

O outro teste molecular, visa diagnosticar aproximadamente 4% dos casos que apresentam uma expansão heterozigótica composta com uma mutação pontual ou deleção, é o sequenciamento de Segunda Geração (NGS) por Captura e CNV. O NGS, apesar de mais caro, é um exame que permite a análise da sequência de nucleotídeos no DNA, conseguindo identificar uma mutação ou deleção pontual que o PCR seria capaz (GENOMIKA, 2020).

4.1.6. Tratamentos atuais

Até 2021, nenhum medicamento tinha sido aprovado clinicamente para a prevenção do início e progressão dos sintomas na FRDA. As estratégias de tratamento eram baseadas na busca de prevenção de possíveis complicações e de um alívio sintomático. Devido a complexidade e variabilidade de sintomas, uma abordagem multidisciplinar se faz necessária, como: o acompanhamento médico, nutricional, fisioterapêutico, psicológico, entre outros (YANG *et al.*, 2021).

Novas alternativas terapêuticas têm sido desenvolvidas como a proteção antioxidante, o aumento da fosforilação oxidativa mitocondrial, a quelação de ferro e, mais recentemente, o aumento da transcrição de frataxina (COOPER:SCHAPIRA, 2007).

O uso da terapia com quinonas foi o mais amplamente estudado até o momento, apresentando diversos benefícios comprovados por meio de avaliações clínicas. A coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) e a vitamina E são importantes antioxidantes mitocondriais e as deficiências de ambas foram relacionadas com a ataxia em geral (COOPER:SCHAPIRA, 2007).

Uma terapia combinada, envolvendo tratamento de longo prazo com altas doses de vitamina E e CoQ₁₀, visou a melhora da função da cadeia respiratória mitocondrial e a diminuição do estresse oxidativo. Esta terapia mostrou um aumento rápido e sustentado na energia gerada pelo músculo cardíaco do indivíduo com FRDA, quase retornando aos níveis fisiológicos. As melhorias na geração de energia do músculo esquelético condizem com as do coração, mas em um nível inferior (COOPER:SCHAPIRA, 2003).

Além da terapia protetiva citada acima, uma terapia que buscou ativar o Nrf2 começou a ser estudada (estudo MOXIe), visando ser a primeira terapia específica para FRDA (ZESIEWICZ *et al.*, 2020).

Em 2020, o resultado do estudo MOXIe, realizado por Lynch e seus colegas, foi divulgado, resultando em conclusões positivas a respeito do uso da Omaveloxona como potencial agente terapêutico para FRDA (LYNCH *et al.*, 2020).

Esse estudo foi um ensaio internacional de fase 2, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo. Os participantes possuíam de 16 a 40 anos de idade, FRDA geneticamente confirmada e escala de classificação de ataxia de Friedreich modificada (mFARS) de linha de base entre 20 e 80 (LYNCH *et al.*, 2020).

O desfecho foi a alteração da linha de base no escore mFARS naqueles tratados com omaveloxolona em comparação com aqueles tratados com placebo em 48 semanas. Assim, a omaveloxolona melhorou significativamente a função neurológica em comparação com o placebo e também foi geralmente segura e bem tolerada (LYNCH *et al.*, 2020).

Em 2023, a FDA, agência reguladora dos Estados Unidos, aprovou o Skyclarys (omaveloxolona) como o primeiro tratamento para a ataxia de Friedreich. Os pacientes tomam as cápsulas de Skyclarys por via oral, sem alimentos, uma vez ao dia na dose recomendada de 150 mg (RESEARCH, 2023).

A aprovação do primeiro medicamento para FRDA, Skyclarys (omaveloxolona), foi de grande importância, visto que este visa controlar e retardar a progressão da doença. Esses fatores dão esperanças aos pacientes e pesquisadores enquanto um método de correção genética ainda não foi aprovado. As terapias gênicas estão em alta nos estudos atuais que visam a cura para FRDA (ZESIEWICZ *et al.*, 2020).

4.2. MÉTODOS DE CORREÇÃO GÊNICA

Atualmente a correção gênica emerge como uma promissora abordagem no campo da medicina e da biotecnologia, oferecendo novas perspectivas para o tratamento de doenças genéticas hereditárias. Por isso, compreender e dominar os métodos de correção gênica é fundamental para desvendar o potencial terapêutico da manipulação direta dos genes (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Segundo Watson (1991)

“Muita gente se diz preocupada com a mudança em nossas instruções genéticas. Mas essas [instruções genéticas] são apenas um produto da evolução, moldadas para nos adaptar a certas condições que podem não mais existir. Todos sabemos o quanto somos imperfeitos. Por que não nos tornar um pouquinho mais aptos à sobrevivência?”

4.2.1. Transferência gênica através de vetor viral

4.2.1.1. Descoberta

A descoberta do uso de vetores virais como ferramenta para transferência de genes é uma das maiores contribuições para a biologia molecular e para a medicina moderna. Richard Mulligan, então professor da Universidade de Harvard, e seu grupo de pesquisa estavam estudando a replicação viral e os mecanismos de integração de genomas virais em células hospedeiras. Em 1979, Mulligan e seus colegas começaram a explorar a possibilidade de usar vírus para transportar genes em células que estavam faltando ou tinham genes defeituosos. Em um artigo publicado em 1980 na revista científica *Cell*, Mulligan descreveu como eles construíram um vetor viral que poderia ser usado para transferir genes em células hospedeiras. O vetor era baseado em um vírus de leucemia murina (MLV) e continha um gene estranho que era incorporado ao genoma do vírus. O vetor foi então usado para infectar células de camundongos, resultando na expressão do gene estranho nas células infectadas (MULLIGAN; CONE, 1984).

Com isso, a descoberta de Mulligan e sua equipe teve um grande impacto na biologia molecular e na medicina moderna possibilitando o uso dos vetores virais em terapia gênica para tratar uma ampla variedade de doenças genéticas, incluindo doenças imunológicas, doenças cardíacas, doenças neurológicas, câncer, além de também utilizá-los em pesquisas e em aplicações biotecnológicas (Tabela 1).

4.2.1.2. Metodologia

A terapia genética é uma abordagem terapêutica que tem como objetivo corrigir ou substituir genes defeituosos que causam doenças. Uma das metodologias utilizadas é a terapia genética por vetor viral, que consiste na utilização de um vírus modificado como vetor para transportar um gene funcional até as células do paciente e se mostrou eficiente em estudos pré-clínicos e clínicos, especialmente em doenças genéticas monogênicas (SOUZA, *et al.*, 2018).

De acordo com o artigo "Terapia genética por vetor viral: revisão e perspectivas", publicado na Revista Pan-Amazônica de Saúde (R-PAS), "o vírus é modificado em laboratório para retirar suas características virulentas e para inserir o gene que será levado para as células do paciente". Após isso e a inserção do gene o vetor viral pode ser produzido em grande escala, permitindo a sua utilização em ensaios clínicos (SOUZA, *et al.*, 2018).

O método de transferência de genes usando vetores virais depende da produção de grandes quantidades de vetor viral em laboratório e a injeção do vetor diretamente no tecido ou no sistema circulatório do paciente, que infecta as células-alvo e entrega o gene terapêutico para o núcleo das células, onde ele pode ser integrado ao genoma da célula hospedeira. A célula então usa o DNA introduzido para produzir proteínas terapêuticas ou para corrigir um defeito genético.

Os autores do artigo explicam que os vetores virais mais utilizados em terapia genética são retrovírus, adenovírus, lentivírus e adeno-associados (AAV) exatamente pelas suas capacidades de inserir seu código genético na célula hospedeira. Cada vetor tem suas vantagens e desvantagens, e a escolha do vetor ideal depende do tipo de doença a ser tratada e do tecido a ser alvo (GONÇALVES, PAIVA, 201; SOUZA, *et al.*, 2018).

Tabela 1. Protocolos de terapia gênica

Doença	Objetivo	Células-alvo	Modo de liberação	Países com o protocolo
Deficiência de adenosina deaminase	Substituição da deficiência de adenosina deaminase	Sangue	Retrovírus	Itália, Holanda e Estados Unidos
Deficiência de α 1-antitripsina	Substituição de α 1-antitripsina	Epitélio respiratório	Lipossoma	Estados Unidos
AIDS	Inativação do antígeno de apresentação do HIV	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Câncer	Aprimoramento da função imune	Sangue, medula e tumor	Retrovírus, lipossoma, eletroporação e transferência mediada por células	Áustria, China, França, Alemanha, Itália, Holanda e Estados Unidos
Câncer	Remoção tumoral	Tumor	Retrovírus, DNA não complexado, transferência mediada por células	Estados Unidos
Câncer	Quimioproteção	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Câncer	Marcação de células-tronco	Sangue, medula e tumor	Retrovírus	Canadá, França, Suécia e Estados Unidos
Fibrose cística	Substituição enzimática	Epitélio respiratório	Adenovírus e lipossoma	Inglaterra e Estados Unidos
Hipercolesterolemia familiar	Substituição de receptores lipoprotéticos de baixa densidade	Fígado	Retrovírus	Estados Unidos
Anemia de Fanconi	Liberação do gene de complemento C	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Doença de Gaucher	Substituição da glucocerebrosidase	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Hemofilia B	Substituição do fator IX	Fibroblastos da pele	Retrovírus	China
Artrite reumatoide	Liberação de citocina	Membrana sinovial	Retrovírus	Estados Unidos

Fonte: Adaptado de Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. J Assoc Physicians India. 2013;61(2):127-33. Review.¹⁸

Tabela 1: Protocolos de Terapia gênica

Fonte: Adaptado de Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. J Assoc Physicians India. 2013;61(2):127-33.

O adenovírus é um vírus de DNA de fita dupla que tem sido amplamente utilizado na terapia gênica, pois possui uma alta eficiência de transdução em muitos tipos de células. O lentivírus é um tipo de retrovírus que pode infectar tanto células em divisão quanto células quiescentes, tornando-o um vetor ideal para a entrega de genes em células do sistema nervoso central. O retrovírus, por sua vez, é um tipo de vírus de RNA que pode integrar o material genético no DNA das células infectadas, o que o torna útil para a terapia gênica de doenças genéticas (SOUZA, *et al.*, 2018).

4.2.1.3. Uso aplicado à medicina e engenharia genética

O artigo "Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B", publicado no New England Journal of Medicine em 2011, apresenta um estudo de caso sobre o uso da terapia genética por vetor viral para tratar a hemofilia B em humanos, sendo a hemofilia B uma doença genética rara que afeta a coagulação do sangue e é causada pela deficiência do fator IX (NATHWANI; *et al.*, 2011).

Os pesquisadores utilizaram um vetor viral baseado em adenovírus associado (AAV) para entregar um gene funcional para as células dos pacientes. O vetor viral contendo o gene do fator IX foi injetado no fígado dos pacientes, onde o gene foi expresso e produziu o fator IX funcional em níveis significativos. No estudo, a terapia genética foi realizada em seis pacientes, todos com hemofilia B grave ou moderada, e os resultados foram promissores (NATHWANI; *et al.*, 2011).

Os mesmos observaram um aumento significativo nos níveis de fator IX em todos os pacientes tratados, com uma média de aumento de cerca de 5% a 10% dos níveis normais. Além disso, os pacientes tratados com a terapia genética por vetor viral não precisaram mais de injeções frequentes de fator IX e experimentaram uma melhoria significativa na qualidade de vida (NATHWANI; *et al.*, 2011).

Este estudo destacou também a importância da escolha do vetor viral correto para a terapia genética, já que os pesquisadores escolheram o vetor viral adeno-associado (AAV) devido à sua segurança e eficácia comprovadas em estudos anteriores que o tornava o melhor candidato por ser capaz de integrar o gene terapêutico no genoma do paciente de forma estável e duradoura (NATHWANI; *et al.*, 2011).

Na conclusão do artigo, os autores afirmam que "este estudo fornece evidências de que a terapia gênica com vetores de AAV é uma abordagem eficaz e segura para o tratamento da hemofilia B" (NATHWANI; *et al.*, 2011). Devido a essa afirmação é conclusivo que a terapia gênica é capaz de proporcionar benefícios significativos, como a redução do risco de sangramento e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

O estudo demonstrou também que o tratamento com terapia gênica não resultou em eventos adversos graves relacionados ao vetor ou à resposta imune (NATHWANI; *et al.*, 2011).

Segundo os autores, "os dados de segurança e eficácia sustentados em longo prazo deste estudo, além de outras investigações em andamento, podem levar à aprovação regulatória da terapia gênica como uma opção de tratamento para a hemofilia B e outras doenças" (NATHWANI; *et al.*, 2011).

Portanto, é evidente que a terapia gênica através de vetores virais, como o AAV, pode trazer grandes avanços no tratamento de diversas doenças genéticas. O

estudo mostra a eficácia e a segurança da terapia gênica em pacientes com doenças genéticas, além de abrir caminhos para novas pesquisas na área. A expectativa é que a terapia gênica possa se tornar uma opção de tratamento amplamente disponível e acessível para pacientes com diversas condições genéticas no futuro.

4.2.2. CRISPR - Cas9

4.2.2.1. Descoberta

A descoberta da técnica de CRISPR foi possível graças ao estudo do sistema de defesa bacteriana contra infecções virais, quando em 2012, Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier lançaram luz sobre o potencial da CRISPR-Cas9 ao publicarem o artigo "CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Escherichia coli* and its Application" na renomada revista Science. Nesse trabalho pioneiro, as pesquisadoras elucidaram a capacidade da técnica para editar o genoma da bactéria *Escherichia coli* por meio da enzima, demonstrando seu potencial para manipular o DNA de forma precisa, garantindo-as o Prêmio Nobel de Química em 2020 pela descoberta (DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E., 2014).

Logo em seguida, em 2013, Feng Zhang liderou uma equipe de cientistas do Instituto Broad em Massachusetts, que publicou o artigo "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", também na revista Science. Esse estudo foi um marco crucial, pois revelou a aplicação bem-sucedida da CRISPR-Cas9 em células-tronco pluripotentes humanas, possibilitando processos diversos e abrindo as portas para inúmeras possibilidades na medicina regenerativa e terapia genética (ZHANG, *et al.*, 2013).

Desde de então, a CRISPR-Cas9 tem sido amplamente adotada pela comunidade científica em todo o mundo por sua especificidade e baixo custo, impulsionando avanços em várias áreas da pesquisa. Seu potencial revolucionário para a correção de mutações genéticas, modificação de organismos e tratamento de doenças genéticas tem gerado uma nova era de esperança e possibilidades na ciência e medicina.

4.2.2.2. Metodologia

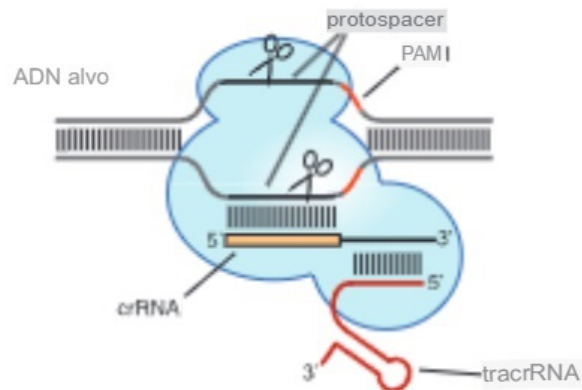
A técnica CRISPR-Cas9 é uma ferramenta poderosa para a edição precisa do DNA em organismos vivos e sua metodologia geral envolve três componentes principais: a molécula CRISPR, a enzima Cas9 e o RNA guia (sgRNA) (DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E., 2014).

A molécula CRISPR é uma sequência de DNA repetitiva que contém espaçadores derivados de sequências de vírus ou outros elementos genéticos que a bactéria previamente encontrou (DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E., 2014).

A enzima Cas9, uma endonuclease, tem como função cortar o DNA na sequência específica determinada pelo RNA guia, que é projetado para ser complementar à sequência alvo do DNA, e direciona a Cas9 para o local desejado no genoma, onde a quebra do DNA ocorre. De forma resumida, a partir desse corte é induzido o reparo do DNA pelas células, permitindo a edição ou inserção de novos genes (DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E., 2014).

Mais especificamente o processo começa com o projeto e síntese de um RNA guia único (sgRNA), que é uma fusão do crRNA e de um RNA trans ativador (tracrRNA). O sgRNA é projetado para ser complementar à sequência de DNA alvo de interesse. Uma vez dentro da célula, o sgRNA forma um complexo com a proteína Cas9, guiando-a para a sequência de DNA alvo (JINEK *et al.*, 2012).

Cas9 programado pelo crRNA: tracrRNA duplex



Cas9 programado por ARN quimérico único

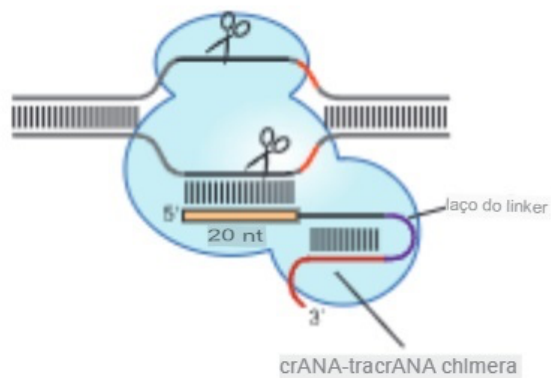


Figura 1: (Acima) Nos sistemas CRISPR/Cas tipo II, a Cas9 é guiada por uma estrutura de dois RNAs formada pela ativação do tracrRNA e pelo direcionamento do crRNA para clivar o DNA de fita dupla específico do local-alvo.

(Abaixo) Um RNA quimérico gerado pela fusão da extremidade 3' do crRNA com a extremidade 5' do tracrRNA.

Fonte: Adaptado de JINEK et al., 2012

Após se ligar ao DNA alvo, a proteína Cas9 induz uma quebra de dupla hélice (DSB) no local específico. A DSB ativa o maquinário de reparo de DNA da célula, que pode resultar em um de dois resultados: junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR). O NHEJ é um mecanismo de reparo propenso a erros que, frequentemente, leva a pequenas inserções ou deleções (indels) no local da DSB, resultando em interrupção do gene. O HDR, por outro lado,

pode ser usado para introduzir alterações ou inserções precisas, fornecendo um modelo de DNA para o reparo (MALI *et al.*, 2013).

O sistema CRISPR-Cas9 oferece várias vantagens em relação às técnicas anteriores de edição do genoma. É altamente específico, permitindo o direcionamento preciso de sequências de DNA desejadas. Além disso, é relativamente fácil projetar e sintetizar o sgRNA, tornando-o uma ferramenta econômica e eficiente para os processos de terapia genética. Além disso, o sistema CRISPR-Cas9 foi aplicado com sucesso em uma ampla variedade de organismos, incluindo células humanas, tornando-o uma ferramenta promissora para aplicações terapêuticas (MALI *et al.*, 2013).

4.2.2.3. Uso aplicado à medicina e engenharia genética

A edição de genes através da CRISPR-Cas9, emergiu como uma abordagem promissora na área da medicina. O artigo intitulado "CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia" demonstra o uso dessa tecnologia para o tratamento dessas doenças genéticas (FRANGOUL *et al.*, 2021).

A doença falciforme e a β -talassemia são distúrbios hereditários do sangue que resultam de mutações em genes específicos. Essas mutações levam à produção anormal de hemoglobina, a proteína responsável por transportar oxigênio no sangue. Pacientes com essas condições, frequentemente, sofrem de anemia grave, crises de dor e danos em órgãos, impactando significativamente sua qualidade de vida (FRANGOUL *et al.*, 2021; SHAFIQUE *et al.*, 2021).

As opções de tratamento tradicionais para a doença falciforme e a β -talassemia, como transfusões de sangue e medicamentos, têm como objetivo gerenciar os sintomas, em vez de oferecer uma cura (SHAFIQUE *et al.*, 2021). No entanto, o surgimento da edição de genes CRISPR-Cas9 abriu novas possibilidades para a correção direcionada e precisa das mutações genéticas subjacentes.

Com o CRISPR os pesquisadores podem, então, fornecer uma versão corrigida do gene, que é incorporada ao DNA durante o processo de reparo, permitindo a correção da mutação genética, potencialmente restaurando a produção normal de hemoglobina (FRANGOUL *et al.*, 2021).

Os resultados do estudo mostraram resultados promissores, com um aumento significativo na produção de hemoglobina normal nas células editadas. Além disso, os pacientes experimentaram uma redução na frequência e gravidade dos sintomas associados à doença falciforme e à β -talassemia. Porém, mesmo que o estudo forneça resultados encorajadores, é importante observar que mais pesquisas e ensaios clínicos são necessários para estabelecer a segurança e eficácia a longo prazo dessa abordagem (FRANGOUL *et al.*, 2021).

Além disso, as considerações éticas em torno da edição de genes em seres humanos devem ser cuidadosamente abordadas para garantir o uso responsável e equitativo dessa tecnologia.

4.2.3. Aptâmeros

4.2.3.1. Descoberta

Os aptâmeros são oligonucleotídeos curtos de DNA ou RNA que têm a capacidade de se ligar a moléculas-alvo específicas com alta afinidade e especificidade (ZHUO *et al.*, 2017). Eles são selecionados por meio de um processo chamado Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX) (TUERK E GOLD, 1990; ELLINGTON E SZOSTAK, 1990). O processo SELEX envolve rodadas de seleção e amplificação, onde uma grande variedade de oligonucleotídeos de sequência aleatória é exposta à molécula-alvo, e as sequências que se ligam à molécula-alvo são isoladas e amplificadas (ZHUO *et al.*, 2017).

A descoberta dos aptâmeros revolucionou o campo da medicina e eles têm sido usados como sondas moleculares eficazes para o estudo principalmente do câncer (SHANGGUAN *et al.*, 2006). Por meio da seleção de aptâmeros baseada em células, foram desenvolvidos aptâmeros específicos para o reconhecimento de células de leucemia sendo que esses aptâmeros podem reconhecer especificamente células de leucemia misturadas com aspirados de medula óssea humana normal e também identificar células cancerígenas intimamente relacionadas à linhagem celular-alvo em amostras clínicas reais (SHANGGUAN *et al.*, 2006). Estas moléculas são promissoras para o desenvolvimento de sondas moleculares específicas para o diagnóstico do câncer e a descoberta de biomarcadores (SHANGGUAN *et al.*, 2006).

4.2.3.2. Metodologia

A metodologia utilizada para o tratamento de doenças genéticas usando aptâmeros e CRISPR envolve uma combinação de seleção de aptâmeros e técnicas de edição genética do CRISPR. A seleção de aptâmeros pode ser realizada utilizando o método de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) (Ellington & Szostak, 1990). O SELEX permite a identificação de aptâmeros que se ligam especificamente ao gene-alvo ou sequência genética de interesse (Ellington & Szostak, 1990). Uma vez selecionados, os aptâmeros podem ser conjugados aos componentes do CRISPR e entregues às células-alvo usando diversos sistemas de entrega, como nanopartículas ou vetores virais (Tuerk & Gold, 1990).

Dentro das células-alvo, o complexo aptâmero-CRISPR pode reconhecer e se ligar especificamente ao gene-alvo ou sequência genética, guiando os componentes do CRISPR para a localização desejada para a alteração genética. Os componentes do CRISPR, incluindo a proteína Cas9 e o RNA guia, iniciam o processo de edição genética, levando às modificações desejadas no genoma (ZHEN et al., 2016). O uso de aptâmeros nesse processo aumenta a especificidade e a eficiência da edição genética do CRISPR, tornando-o uma abordagem promissora para o tratamento de doenças genéticas.

4.2.3.3. Uso aplicado à medicina e engenharia genética

Os aptâmeros também têm mostrado potencial no campo de terapêutica. Eles possuem propriedades de reconhecimento molecular similares aos anticorpos, mas com vantagens adicionais. Ao contrário dos anticorpos, os aptâmeros podem ser facilmente modificados quimicamente para estender suas vidas em fluidos biológicos e melhorar sua biodisponibilidade em animais (BUNKA & STOCKLEY, 2006). Os primeiros medicamentos clínicos baseados em aptâmeros entraram recentemente em serviço (BUNKA & STOCKLEY, 2006). Embora nenhum aptâmero que visa fatores de coagulação do sangue tenha sido aprovado para uso clínico, vários aptâmeros foram

avaliados em ensaios clínicos e demonstraram resultados encorajadores (LIU *et al.*, 2021).

Os aptâmeros têm mostrado grande potencial também em associação com processos de alteração genética, como o CRISPR, para o tratamento de doenças genéticas. O CRISPR é uma tecnologia revolucionária que permite modificações precisas no genoma (Tuerk & Gold, 1990) e os aptâmeros podem ser utilizados em conjunto com o CRISPR para aumentar sua eficiência e especificidade na mira de genes ou sequências genéticas específicas.

Esse sistema de entrega direcionada aumenta a eficiência da edição genética do CRISPR e reduz os efeitos fora do alvo, pois o aptâmero direciona os componentes do CRISPR apenas para as células pretendidas (ZHEN *et al.*, 2016).

Além disso, os aptâmeros também podem ser usados para regular a atividade dos componentes do CRISPR. Ao projetar aptâmeros que se ligam especificamente à proteína Cas9 ou ao RNA guia, os pesquisadores podem modular sua função e controlar o tempo e a duração da edição genética (ZHEN *et al.*, 2016). Essa abordagem permite um controle preciso sobre o processo de alteração genética, minimizando os possíveis efeitos colaterais e otimizando os resultados terapêuticos.

4.3. MÉTODOS DE CORREÇÃO GÊNICA APLICADO A ATAXIA DE FRIEDREICH

Como citado anteriormente, a ataxia de Friedreich é uma doença monogênica, causada pela mutação em um único gene, o gene da FXN. Sendo assim, ela é uma ótima candidata para a aplicação de métodos que visam corrigir esse gene (OUELLET *et al.*, 2016).

Abordando a terapia gênica direcionada para FRDA, diversos projetos de pesquisa estão visando aumentar o nível de proteína frataxina, utilizando células e modelos de camundongo que possuem a mutação responsável pela FRDA (ZESIEWICZ *et al.*, 2020).

Nesse capítulo, visamos abordar alguns estudos que buscam a correção da alteração genética presente em indivíduos com Ataxia de Friedreich.

4.3.1. Vetor HSV-1 amplicon (Viral)

Estudos diversos vêm sendo desenvolvidos para frear a progressão da Ataxia, como o artigo de Filip Lim e seus colegas que discute o uso de técnicas de transferência de genes para tratar a ataxia utilizando um vetor HSV-1 para entregar o gene da frataxina aos neurônios em um modelo de camundongo com FDRA (LIM, *et al.* 2007).

O estudo possui como objetivo principal trazer um tratamento capaz de recuperar a função neurológica de pacientes com a Ataxia por meio de um agente terapêutico que visa a correção da deficiência de frataxina.

Inicialmente no estudo foram geradas linhagens com o gene mutado que codifica a ataxia que foram referenciados no estudo como “camundongos loxP [frda]”. Para isso, foi utilizada injeção estereotáxica no núcleo olivar inferior de camundongos adultos, que permitiu o knockout (desativação) localizado do gene com subsequente transferência do gene mutado para estudar os efeitos na expressão da frataxina. Buscaram também caracterizar a disseminação da solução injetada no cérebro dos camundongos usando um traçador neuronal (Fluoro-ruby) (Figura 2) e examinaram a expressão do vetor na medula dos camundongos a fim de analisar a eficácia da entrega do gene (LIM, *et al.* 2007).

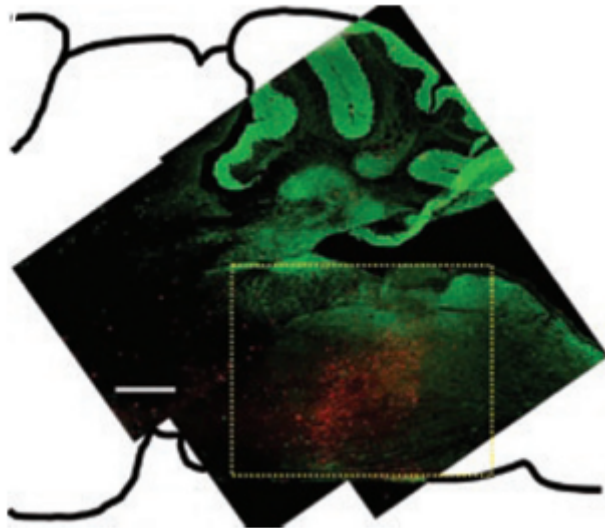


Figura 2: Expressão do vetor na medula óssea dos camundongos através do traçador neuronal *Fluoro-ruby*

Fonte: LIM, *et al.* 2007

Após o processo, os genes de interesse foram introduzidos nos neurônios corticais primários dos camundongos por meio dos vetores pHLC e pHF (Figura 3 - 2 e 3, respectivamente), e foram feitos controles rigorosos para garantir a consistência nas quantidades carregadas de genes, utilizando as proteínas de tubulina e actina (Figura 4) visando garantir que as quantidades fossem consistentes entre as amostras e a expressão da beta-galactosidase e CRE recombinase, que indicam sucesso na introdução dos genes nos neurônios (LIM, *et al.* 2007).

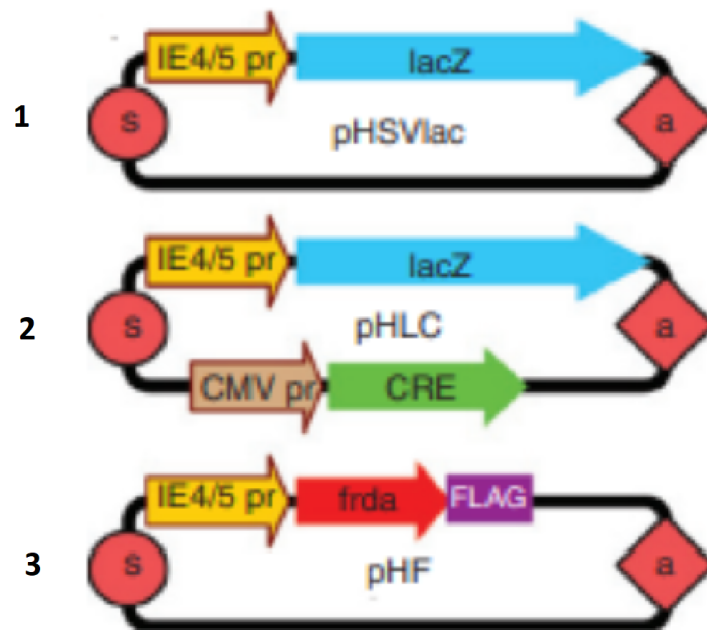


Figura 3: Vetores pHLC e pHF utilizados para introduzir os genes de interesse nos neurônios corticais de camundongos

Fonte: LIM, *et al.* 2007

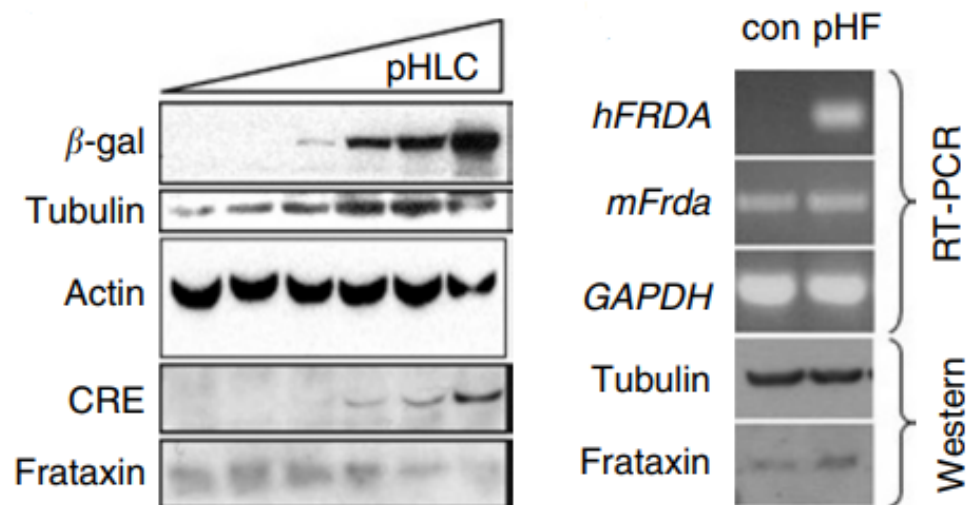


Figura 4: RT-PCR e Western blot realizados para garantir e indicar o sucesso na introdução dos genes.

Fonte: LIM, *et al.* 2007

Observou-se uma diminuição correlacionada nos níveis de frataxina nas mesmas amostras de neurônios, sugerindo que a CRE recombinase expressa estava funcional e capaz de inativar o gene *frda* nos neurônios infectados ao remover o exon-4. O vetor pHF também demonstrou sua capacidade de aumentar a expressão da frataxina humana nos neurônios, que foi observada por meio da técnica de Western blot (Figura 4) quando comparadas as amostras infectadas com os controles. Importante ressaltar que a infecção dos vetores não afetou a expressão endógena de frataxina do camundongo (LIM, *et al.* 2007).

Importante destacar que o estudo mostrou que essa abordagem de transferência gênica resultou em recuperação funcional no modelo de camundongo, indicando o potencial benefício terapêutico dessa abordagem para o tratamento da FA (LIM, *et al.* 2007).

4.3.2. CRISPR-Cas9 em células tronco hematopoiéticas

Diversos estudos utilizando CRISPR-Cas9 vêm sendo desenvolvidos com o intuito da correção genética da mutação causadora da FRDA. O estudo que vamos dar o enfoque principal neste subcapítulo é o “CRISPR-Cas9 Gene Editing of Hematopoietic Stem Cells from Patients with Friedreich’s Ataxia”, escrito por Rocca e seus colegas em 2020 (ROCCA *et al.*, 2020).

O objetivo principal do estudo foi desenvolver uma abordagem de transplante autólogo de HSPC para o restabelecimento fisiológico na FRDA, utilizando a edição por CRIPR-Cas9 das HSPCS para a remoção da expansão do trinucleotídeo GAA (ROCCA *et al.*, 2020).

Um dos fatores que justificam a realização deste estudo é que, anteriormente, foi relatado pelo mesmo grupo que o transplante singênico de células-tronco hematopoiéticas (HSPC) preveniam a neurodegeneração no modelo de camundongo YG8R. Foi visto que o mecanismo de prevenção foi mediado pela transferência da frataxina funcional de células HSPCs editadas, que se diferenciam nos tecidos em células da microglia e macrófagos, para os neurônios e miócitos. Os resultados

demonstraram o potencial das HSPCs como veículos de entrega de frataxina funcional a tecidos doentes (ROCCA *et al.*, 2020).

Para a realização do novo estudo, foi coletado 100ml de sangue periférico de indivíduos portadores de FRDA e para o controle, foi obtido amostras de duas formas: uma foi adquirindo CD34 e HSPCs de doadores saudáveis por meio de bolsas que passaram pelo procedimento de leucoferese e outra foi adquirindo 500 mL de sangue periférico recém-retirado do Scripps Serviço de Doação de Sangue Normal da Research (ROCCA *et al.*, 2020).

O sangue periférico adquirido foi diluído em PBS, solução salina tamponada com fosfato. Após a diluição, os glóbulos brancos foram separados dos glóbulos vermelhos e do plasma utilizando o Ficcol-Paque Plus, um método de separação por sedimentação. Em seguida, os HSPCs CD34+ foram isolados usando o kit CD34 MicroBead humano Miltenyi Biotec MACS (Miltenyi Biotec, San Diego, CA, EUA) e com 100 ml de sangue periférico, foi obtido uma média de $1,5 \times 10^6$ HSPCs CD34+, que foram posteriormente cultivadas (ROCCA *et al.*, 2020).

Foram projetados seis RNAs guias (crRNAs) e ambos foram testados nas células com FRDA (Quadro 1). Três dias após a transfecção com diferentes combinações de RNAs guias foi realizado um PCR visando a amplificação das repetições de GAA, com tamanho esperado de aproximadamente 5 kb. O par guia UP4/DN4 exibiu maior eficiência na deleção da hiperexpansão das repetições de GAA, resultando em um fragmento de aproximadamente 2 kb (ROCCA *et al.*, 2020).

	Sequence	chromosome	position (Hg19, 5' from PAM)	strand	RS2 score
UP3	TATCTGACCCAGTTACGCCA	chr9	71651670	+	0.6855
UP4	TTACGCCACGGCTTGAAAGG	chr9	71651682	+	0.6256
UP5	CAAGCCTAAAGTACAAACTC	chr9	71651959	-	0.6159
DN3	AATAGCCCTTAACAGCCACC	chr9	71652949	-	0.6829
DN4	ACCGGCGTCATATGGTAAG	chr9	71654821	+	0.6075
DN5	TCAGGACCCATACCTCGCAG	chr9	71656533	-	0.7351

Quadro 1: Sequências de RNAs guias

Fonte: ROCCA *et al.*, 2020.

O protocolo de excisão das repetições de GAA nos linfoblastos foi otimizado utilizando 4 ribonucleoproteínas, proteínas envolvidas no transporte núcleo

citoplasmático de RNA e na estabilidade do RNA mensageiro no citoplasma, e a eletroporação, técnica que envolve a aplicação de pulsos elétricos de alta tensão que aumentam o potencial de transporte da membrana, promovendo a formação transitória de poros aquosos. Além disso, também foi adicionado em algumas células um intensificador de eletroporação, que se baseia em um oligonucleotídeo de DNA de fita simples que não possui homologia com o genoma humano, buscando um aumento de captação dos ribonucleoproteínas (ROCCA *et al.*, 2020).

Buscando encontrar um abordagem ideal para remoção da hiperexpansão, foi avaliado a eficiência da edição do gene FXN por PCR digital de gotículas e foi visto que a eficiência da edição genética foi duas vezes maior quando a eletroporação foi realizada na presença do intensificador (39,8% –61,9% versus 17% –29,9%), ou seja, esse cenário seria o ideal para a edição certa (ROCCA *et al.*, 2020).

Após a edição, foi quantificado a frataxina e os níveis de mRNA em linfoblastos saudáveis (controle) e em células com FRDA. Foi visto que os linfoblastos saudáveis com 60% de eficiência de edição genética não tiveram diferença na expressão de frataxina tanto nos níveis de mRNA quanto no de proteína. Em contraste, foram observados aumentos significativos na expressão da frataxina tanto nos níveis transcricionais como traducionais nos linfoblastos FRDA modificados com a edição genética feita no cenário ideal, quando comparado com células não tratadas, o que levou a uma expressão de frataxina comparável à do portador assintomático e às linhas celulares saudáveis (ROCCA *et al.*, 2020).

No geral, os dados obtidos a partir de células CD34 + demonstraram uma elevada porcentagem de excisão repetida de GAA e capacidade normal de diferenciação de linhagem hematopoiética *in vivo* e *in vitro* , apesar da super expressão do p53, que atrasou a proliferação celular em linfoblastos (ROCCA *et al.*, 2020).

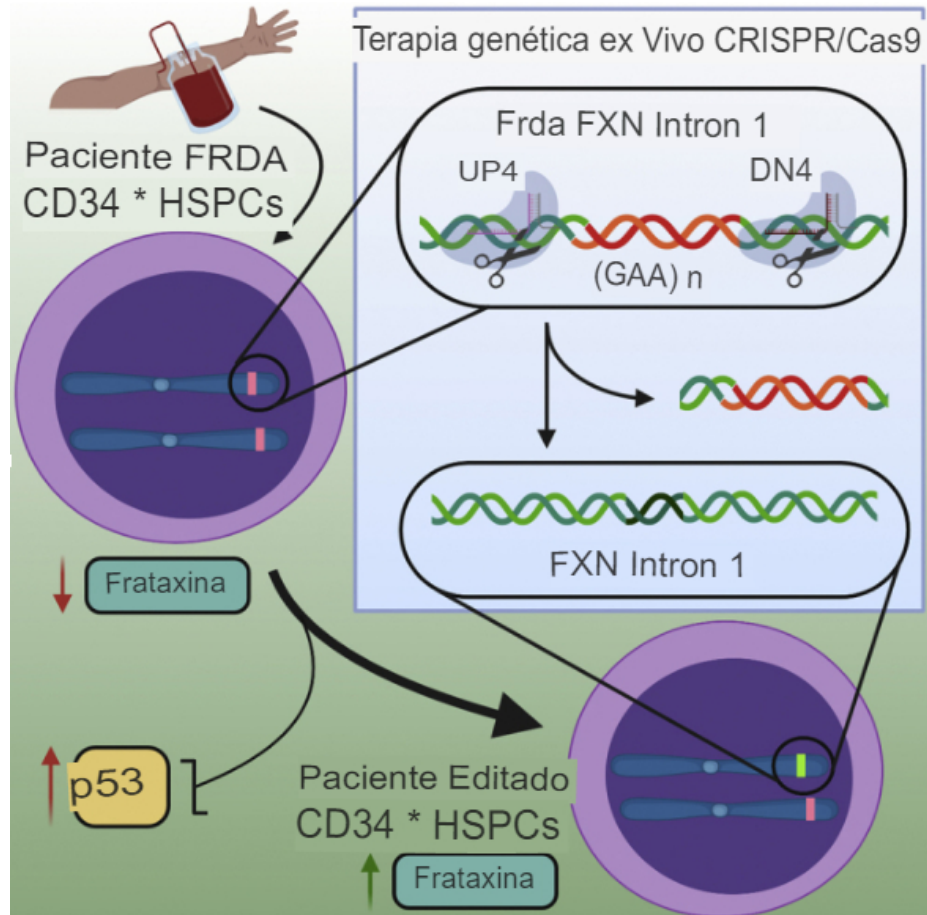


Figura 6: Esquema do funcionamento da terapia de edição genética ex vivo por CRISPR/CAS9

Fonte: ROCCA *et al.*, 2020

Os resultados obtidos neste estudo apoiam o uso do CRISPR-Cas9 para remover a expansão GAA em células CD34 + de pacientes com FRDA , levando ao resgate fisiológico da expressão da frataxina, quando a porcentagem de edição genética é suficientemente alta. A edição não apresentou efeitos citotóxicos *in vitro* ou *in vivo* , representando um grande passo em direção ao transplante autólogo de HSPCs corrigidos por genes para FRDA (ROCCA *et al.*, 2020).

4.3.3. Aptâmeros (DT-216)

Uma nova abordagem vem sendo desenvolvida pela Design Therapeutics, empresa de biotecnologia localizada na Califórnia, Estados Unidos. Esta visa o desenvolvimento de moléculas denominadas GeneTAC™ (Gene Target Chimera), compostas por duas porções principais, uma porção de ligação ao DNA e uma porção ligante a maquinaria transcricional da célula. Essas pequenas moléculas são projetadas para atuar especificamente no alelo mutante causador de certa doença, regulando a maquinaria transcricional da célula (“Our Approach – Design Therapeutics”, [s.d.]).

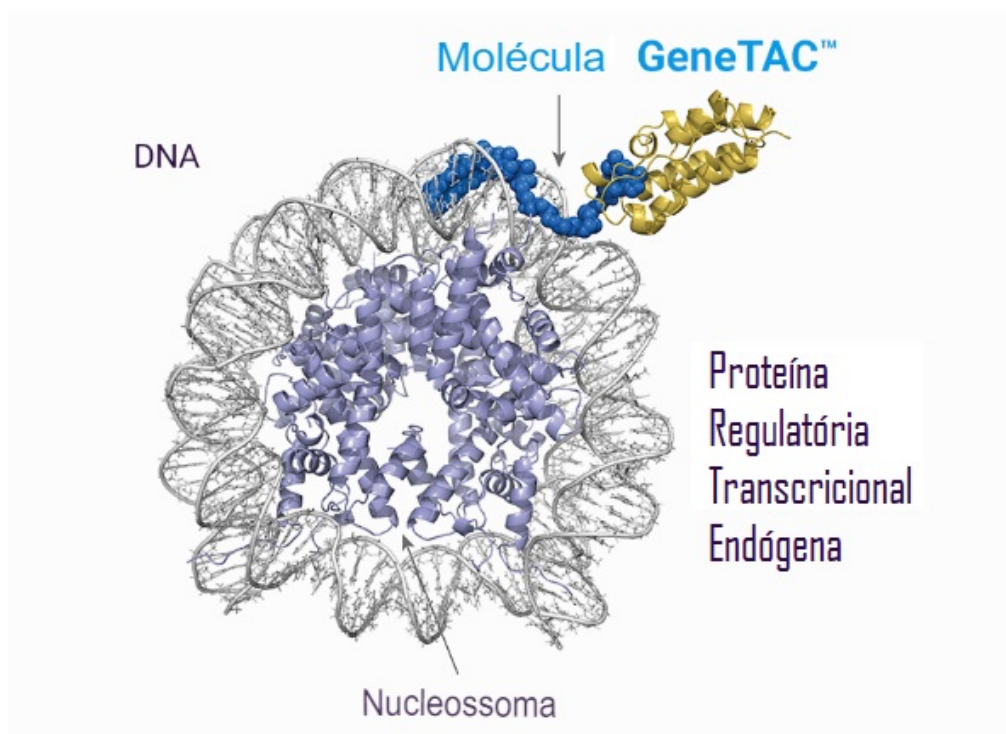


Figura 7: Representação gráfica da molécula GeneTAC™ ligada ao DNA

Fonte: “Our Approach – Design Therapeutics”

Tendo como alvo a Ataxia de Friedreich, a empresa desenvolveu uma molécula denominada DT-216, que busca ativar a transcrição do gene FXN e restaurar a produção da proteína frataxina. Essa foi projetada para atingir especificamente a

expansão de repetições do trinucleotídeo GAA e desbloquear a maquinaria transcricional, restaurando a expressão de mRNA que se converte em frataxina funcional (“Design Therapeutics Reports Positive Data from Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress”, 2022).

A primeira fase do estudo da nova molécula já foi realizada e seus resultados foram divulgados recentemente. Essa contou com um ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, e foi projetada para avaliar doses únicas de DT-216 administradas por via intravenosa em 39 indivíduos adultos portadores de FRDA. Dos 39 indivíduos participantes, 26 receberam doses de DT-216 e 13 receberam placebo. Os pacientes foram divididos em seis grupos, de acordo com a dosagem de DT-216 que iriam receber. Os grupos de 1 a 4 receberam doses crescentes variando de 25mg a 200mg, o grupo 5 recebeu 400mg e o grupo 6 recebeu 600mg (“Design Therapeutics Reports Positive Data from Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress”, 2022).

O objetivo principal do estudo foi avaliar a segurança, tolerabilidade e farmacocinética do DT-216 em indivíduos com FRDA, e foi visto que a molécula em estudo foi bem tolerada durante o ensaio de fase 1, não apresentando nenhum efeito adverso grave. Não houve alterações clinicamente significativas no eletrocardiograma, testes de função hepática, creatinina sérica e exames físicos. Três pacientes relataram trombose venosa superficial autolimitada no local da injeção (“Design Therapeutics Reports Positive Data from Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress”, 2022).

Avaliando os eventos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, foi visto que o nível plasmático de DT-216 aumentou proporcionalmente à dose, com concentração máxima atingida dentro de minutos e com diminuição de concentração em algumas horas. O tratamento com dose única nos grupos de 100mg a 600mg resultou em um aumento variando de 1,24 a 2,62 vezes na quantidade de mRNA de frataxina, em comparação com o valor basal de pré-injeção, após 24 horas da administração. Essas medições foram realizadas em células mononucleares do sangue periférico, PBMCs, derivadas dos indivíduos com FRDA participantes (“Design Therapeutics Reports Positive Data from Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress”, 2022).

Foi visto também que na exposição plasmática de curto prazo, como realizada no estudo, não houve aumento significativo na quantidade da proteína frataxina. Porém, no tratamento ex vivo de PBMCs derivadas de indivíduos participantes do estudo, com duração de 60 horas, foi constatado uma duplicação dos níveis da proteína, indicando que, com duração suficiente de exposição ao DT-216, o aumento na concentração de mRNA é naturalmente traduzido para um aumento na concentração de frataxina (“Design Therapeutics Reports Positive Data from Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress”, 2022).

Com esses resultados, publicados em dezembro de 2022, a Design Therapeutics já está programando a sequência do estudo (“Design Therapeutics Reports Positive Data from Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress”, 2022).

5. CONCLUSÃO

Por meio desta revisão bibliográfica, reunimos informações atuais quanto ao desenvolvimento de diferentes soluções biotecnológicas para a correção ou minimização dos efeitos causados pela expansão homozigótica presente em indivíduos com Ataxia de Friedreich, destacando sua importância, viabilidade, vantagens e desvantagens, e desafios.

Devido a complexidade de fatores que levam a Ataxia de Friedreich, os tratamentos atuais somente garantem a melhora da qualidade de vida provisória do paciente ou a redução da velocidade do desenvolvimento da doença, não existindo ainda tratamento que seja capaz de reverter o quadro da doença ou estagná-lo por completo. (ROCHA, 2011).

As pesquisas científicas na área das doenças raras vêm crescendo e isso reflete uma preocupação da ciência com todos. Porém, o número de pesquisas ainda é bem mais baixo do que quando comparadas a doenças de alta prevalência. Isso nos indica a importância de serem feitas pesquisas e de serem trazidos financiadores para a área.

Sabendo disso, buscamos abordar e agrupar novas futuras possibilidades de tratamentos principalmente utilizando da terapia celular e genética associados à biotecnologia, justificados pela carência atual de tratamentos definitivos direcionados a Ataxia de Friedreich. Na revisão, foram abordadas as tecnologias de terapia gênica, sendo por meio do uso de vetores virais, da utilização do sistema CRISPR-Cas9 ou do uso de aptâmeros.

As terapias visam de diferentes formas, corrigir a alteração que leva a desregulação de expressão de frataxina. Essa proteína foi associada a diversas funções mitocondriais, e a diminuição de concentração desta leva à desregulação da homeostase do ferro mitocondrial e ao consequente dano oxidativo. O dano gerado é tão significativo que gera morte mitocondrial e a consequente morte neuronal. A diminuição na quantidade de neurônios periféricos funcionais acarreta todos os sintomas da doença, sendo os principais a falta de coordenação e o desequilíbrio.

Com o decorrer da revisão foi visto que ambas as pesquisas abordadas apresentam resultados significativos na correção da expansão gênica e na

desaceleração da neurodegeneração causada pela doença, demonstrando uma perspectiva positiva em relação a utilização de processos biotecnológicos para a correção da alteração genética em indivíduos com ataxia de Friedreich, fazendo com que seja de grande importância a contínua realização de pesquisas que visam essa correção.

6. REFERÊNCIAS

ACKROYD, R. S.; FINNEGAN, J. A.; GREEN, S. H. **Friedreich's ataxia. A clinical review with neurophysiological and echocardiographic findings.** Archives of Disease in Childhood, v. 59, n. 3, p. 217–221, 1 mar. 1984. Acesso em: 16 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6231891/>

ADINOLFI, S. **A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins.** Human Molecular Genetics, v. 11, n. 16, p. 1865–1877, 1 ago. 2002. Acesso em: 17 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12140189/>

ANZALONE, A. V.; KOBLAN, L. W.; LIU, D. R. **Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors.** Nature Biotechnology, v. 38, n. 7, p. 824–844, 22 jun. 2020. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1038/s41587-020-0561-9>

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças raras.** São Paulo, 2022. Acesso em: 2 dez. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-raras>

CAMPUZANO, V. et al. **Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion.** Science, v. 271, n. 5254, p. 1423–1427, 8 mar. 1996. Acesso em: 3 mai. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8596916/>

CARTER, J.; WIEDENHEFT, B. SnapShot: **CRISPR-RNA-Guided Adaptive Immune Systems.** Cell, v. 163, n. 1, p. 260-260.e1, set. 2015. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4668126/pdf/nihms737248.pdf>

CEPID BRAINN. **Ataxia de Friedreich: estudo revela novos insights sobre patogênese da doença** | Acesso em: 05 nov. 2023. Disponível em: <<https://www.brainn.org.br/ataxia-de-friedreich-estudo-revela-novos-insights-sobre-patogenese-da-doenca/>>.

CHAWLA, Jasvinder. **Friedreich Ataxia**. Medscape, 2021. Acesso em: 2 dez. 2022. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/1150420-overview>

CONE RD, MULLIGAN RC. **High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Oct;81(20):6349-53. doi: 10.1073/pnas.81.20.6349. PMID: 6093098; PMCID: PMC391921. Acesso em: 23 mar. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1073/pnas.81.20.6349>

CONG, L. et al. **Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems**. Science, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 3 jan. 2013. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1126/science.1231143>

COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. V. **Friedreich's Ataxia: Disease mechanisms, antioxidant and Coenzyme Q10 Therapy**. BioFactors, v. 18, n. 1-4, p. 163–171, 2003. Acesso em: 20 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14695932/>

COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. V. **Friedreich's ataxia: Coenzyme Q10 and vitamin E therapy**. Mitochondrion, v. 7, p. S127–S135, jun. 2007. Acesso em: 29 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485244/>

COSSÉE, M. et al. **Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes**. Annals of Neurology, v. 45, n. 2, p. 200–206, fev. 1999. Acesso em: 5 mai. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9989622/>

DAVID H.J. BUNKA; STOCKLEY, P. G. **Aptamers come of age – at last.** Nature Reviews Microbiology, v. 4, n. 8, p. 588–596, 1 ago. 2006. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1458>

DELATYCKI, M. B.; CORBEN, L. A. **Clinical Features of Friedreich Ataxia.** Journal of Child Neurology, v. 27, n. 9, p. 1133–1137, 29 jun. 2012. Acesso em: 10 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22752493/>

Design Therapeutics Reports Positive Data from **Single-Ascending Dose Trial of DT-216 for the Treatment of Friedreich Ataxia and Portfolio Progress.** [s.l.: s.n.]. . Acesso em: 4 set. 2023. Disponível em: <https://investors.designtx.com/node/7376/pdf>

DIÁZ-NILDO, Javier; OCANA-SANTERO, Gabriel; HERRANZ-MARTÍN, Saúl. **Future Prospects of Gene Therapy for Friedreich’s Ataxia.** NIH - National Library of Medicine, 2021. Acesso em: 2 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7918362/>

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.** Science, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 27 nov. 2014. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1126/science.1258096>

FILLA, A. et al. **Genetic data and natural history of Friedreich’s disease: a study of 80 Italian patients.** Journal of Neurology, v. 237, n. 6, p. 345–351, out. 1990. Acesso em 29 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2277267/>

FRANGOUL, H. et al. **CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia.** New England Journal of Medicine, v. 384, n. 3, 5 dez. 2020. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1056/NEJMoa2031054>

FRIEDREICH, N. **Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge.** Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin, v. 26, n. 3-4, p. 391–419, maio 1863. Acesso em: 2 mai. 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01930976>

FU, Z.; XIANG, J. **Aptamer-Functionalized Nanoparticles in Targeted Delivery and Cancer Therapy**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 23, p. 9123, 30 nov. 2020. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33266216/>

GENOMIKA - **Catálogo online de exames genéticos** | Genomika Diagnósticos. Acesso em: 2 ago. 2023. Disponível em: <https://loja-genomika.einstein.br/doencas/FRDA/>

GEOFFROY, G. et al. **Clinical Description and Roentgenologic Evaluation of Patients with Friedreich's Ataxia**. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, v. 3, n. 4, p. 279–286, 1 nov. 1976. Acesso em: 25 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1087179/>

GONÇALVES, G. A. R., & PAIVA, R. M. A. (2017). **Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas [Gene therapy: advances, challenges and perspectives]. (Tese de Doutorado)**. Belém, Pará, Brasil: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. doi: 10.1590/S1679-45082017RB4024. Acesso em: 23 mar. 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/cPw3g6fGY8srqk5hs83dDKR/?lang=pt&format=pdf>

GONZÁLEZ-CABO, P.; PALAU, F. **Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia**. *Journal of Neurochemistry*, v. 126, p. 53–64, 17 jul. 2013. Acesso em: 2 dez 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23859341/>

HALL, C. N. et al. **Oxidative Phosphorylation, Not Glycolysis, Powers Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Brain Information Processing**. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 26, p. 8940–8951, 27 jun. 2012. Acesso em: 15 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745494/>

HARDING, A. E. **Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features.** *Brain*, v. 104, n. 3, p. 589–620, 1981. Acesso em: 29. jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7272714/>

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. **CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms.** *Annual Review of Biophysics*, v. 46, n. 1, p. 505–529, 22 maio 2017. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>

JINEK, M. et al. **A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.** *Science*, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 28 jun. 2012. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.1225829>

JING DU. et al. **Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis.** *Redox Biology*, v. 32, p. 101483, 1 maio 2020. Acesso em: 20 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32169822/>

Knowledge @ AMBOSS - **Friedreich ataxia.** Acesso em: 07 nov. 2023. Disponível em: <https://www.amboss.com/us/knowledge/friedreich-ataxia>.

KOEPPEN, Arnulf. Friedreich's ataxia: **Pathology, pathogenesis, and molecular genetics.** NIH - National Library of Medicine, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062632/> Acesso em: 2 dez. 2022.

LABELLE, H. et al. **Natural history of scoliosis in Friedreich's ataxia.** *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, v. 68, n. 4, p. 564–572, 1 abr. 1986. Acesso em: 20 jul.2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3957980>

LAMARCHE, J. B.; CÔTÉ, M.; LEMIEUX, B. **The Cardiomyopathy of Friedreich's Ataxia Morphological Observations in 3 Cases.** Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques, v. 7, n. 4, p. 389–396, nov. 1980. Acesso em: 2 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6452194/>

LIU, M.; ZAMAN, K.; FORTENBERRY, Y. M. **Overview of the Therapeutic Potential of Aptamers Targeting Coagulation Factors.** International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 8, p. 3897, 9 abr. 2021. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/3897>

LIM, F. et al. **Functional Recovery in a Friedreich's Ataxia Mouse Model by Frataxin Gene Transfer Using an HSV-1 Amplicon Vector.** Molecular Therapy, v. 15, n. 6, p. 1072–1078, jun. 2007. Acesso em: 12 set. 2023. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1525-0016%2816%2931663-X>

LYNCH, D. R. et al. **Safety and Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia (MOXIe Study).** Annals of Neurology, v. 89, n. 2, p. 212–225, 1 fev. 2021. Acesso em: 30 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33068037/>

MA, Y.; ZHANG, L.; HUANG, X. **Genome modification by CRISPR/Cas9.** FEBS Journal, v. 281, n. 23, p. 5186–5193, 7 nov. 2014. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1111/febs.13110>

MALI, P. et al. **RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.** Science, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 3 jan. 2013. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1232033>

MUHLENHOFF, U. **The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins.** Human Molecular Genetics, v. 11, n. 17, p. 2025–2036, 15 ago. 2002. Acesso em: 3 mai. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12165564/>

NATHWANI A. C., TUDDENHAM E. G. et al. **Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B**. *N Engl J Med*. 2011 Dec 22;365(25):2357-65. doi: 10.1056/NEJMoa1108046. Epub 2011 Dec 10. PMID: 22149959; PMCID: PMC3265081. Acesso em: 23 mar. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1056/NEJMoa1108046>

OLIVEIRA, B. A., FRANÇA, E. S., SOUZA, V. G., VALLINOTO A. C. R., & SILVA, A. N. M. R. (2018). **Vetores virais para uso em terapia gênica [Viral vectors for gene therapy]**. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 9(2), 55-64. Acesso em: 23 mar. 2023. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v9n2/2176-6223-rpas-9-02-57.pdf>

Our Approach – **Design Therapeutics**. Acesso em: 4 set. 2023. Disponível em: <https://www.designtx.com/our-approach/>

OUELLET, D. L. et al. **Deletion of the GAA repeats from the human frataxin gene using the CRISPR-Cas9 system in YG8R-derived cells and mouse models of Friedreich ataxia**. *Gene Therapy*, v. 24, n. 5, p. 265–274, 26 dez. 2016. Acesso em: 04 set. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28024081/>

PARKINSON, M. H. et al. **Clinical features of Friedreich’s ataxia: classical and atypical phenotypes**. *Journal of Neurochemistry*, v. 126, p. 103–117, 17 jul. 2013. Acesso em: 25 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23859346/>

PASTORE, A.; PUCCIO, H. **Frataxin: a protein in search for a function**. *Journal of Neurochemistry*, v. 126, p. 43–52, 17 jul. 2013. Acesso em: 20 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23859340/>

PEKKURNAZ, G.; WANG, X. **Mitochondrial heterogeneity and homeostasis through the lens of a neuron**. *Nature Metabolism*, v. 4, n. 7, p. 802–812, 1 jul. 2022. Acesso em: 10 jun. 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42255-022-00594-w>

QI, J. et al. **Aptamer–Gemcitabine Conjugates with Enzymatically Cleavable Linker for Targeted Delivery and Intracellular Drug Release in Cancer Cells.** *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 5, p. 558, 30 abr. 2022. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/5/558>

RAQUEL, Diana. **Ataxia de Friedreich Revisão Bibliográfica e caso clínico.** 2011. Tese (Mestrado em Medicina) - Curso de Medicina - Universidade do Porto, Porto, 2011. Acesso em: 20 mar. 2023. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/63609/2/Ataxia%20de%20Friedreich%20%20Reviso%20Bibliografica%20e%20Caso%20Clinico.pdf>

RAVAT, D.; PATEL, A.; PATANI, P. **The Therapeutic Applications of Aptamers and Aptamer-Conjugated Nanoparticles in Cancer, Inflammatory and Viral Diseases.** *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, p. 1936–1942, 7 nov. 2022. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://pnrjournal.com/index.php/home/article/view/3074>

RESEARCH, C. FOR D. E. AND. **FDA approves first treatment for Friedreich’s ataxia.** FDA, 28 fev. 2023. Acesso em: 29 jul. 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-first-treatment-friedreichs-ataxia>

ROCCA, Celine *et al.* **CRISPR-Cas9 Gene Editing of Hematopoietic Stem Cells from Patients with Friedreich’s Ataxia.** NIH - National Library of Medicine, 2020. Acesso em: 02 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7240056/>

ROCHA, Martina. **Ataxia de Friedreich Perspectivas de Tratamento.** 2011. Tese (Mestrado em Medicina) - Curso de Ciências da Saúde - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011. Acesso em: 02 dez. 2022. Disponível em: <http://www.luzimarteixeira.com.br/wp-content/uploads/2015/09/ATAXIA-DE-FRIEDREICH-TRATAMENTO.pdf>

RUMMEY, C. et al. **Harmonizing results of ataxia rating scales: mFARS, SARA, and ICARS.** *Annals of Clinical and Translational Neurology*, v. 9, n. 12, p. 2041–2046, 16 nov. 2022. Acesso em: 21 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36394163/>

SCHADT, K. et al. **Cross-Sectional Analysis of Electrocardiograms in a Large Heterogeneous Cohort of Friedreich Ataxia Subjects.** v. 27, n. 9, p. 1187–1192, 29 jun. 2012. Acesso em: 19 jul. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674639/>

SHANGGUAN, D. et al. **Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 32, p. 11838–11843, 8 ago. 2006. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0602615103>

SHAFIQUE, F. et al. **Thalassemia, a human blood disorder.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, 2023. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/73sD7WKNCqMVfBgh6zsTkSQ/?format=pdf&lang=en>

SIVAKUMAR, Anusha; CHERQUI, Stephanie. **Advantages and Limitations of Gene Therapy and Gene Editing for Friedreich's Ataxia.** NIH - National Library of Medicine, 2022. Acesso em: 02 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9157421/>

TUERK, C.; GOLD, L. **Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase.** *Science*, v. 249, n. 4968, p. 505–510, 3 ago. 1990. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2200121>

YANJIE, Li *et al.* **Premature transcription termination at the expanded GAA repeats and aberrant alternative polyadenylation contributes to the *Frx1* transcriptional deficit in Friedreich's ataxia.** NIH - National Library of Medicine, 2022. Acesso em: 02 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9558844/>

ZESIEWICZ, T. A. *et al.* **Emerging therapies in Friedreich's Ataxia.** Expert review of neurotherapeutics, v. 20, n. 12, p. 1215–1228, 1 dez. 2020. Acesso em: 29 jul. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32909841/>

ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X. **CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges.** Human Molecular Genetics, v. 23, n. R1, p. R40–R46, 20 mar. 2014. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1093/hmg/ddu125>

ZHEN, S. *et al.* **Targeted delivery of CRISPR/Cas9 to prostate cancer by modified gRNA using a flexible aptamer-cationic liposome.** Oncotarget, v. 8, n. 6, 21 dez. 2016. Acesso em: 02 out. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354738/pdf/oncotarget-08-9375.pdf>

ZHUO, Z. *et al.* **Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine.** International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 10, p. 2142, 14 out. 2017. Acesso em: 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2142>