

Larissa Costa Lima – RA: SPGR004075

**TERAPIA GÊNICA PARA O ALZHEIMER: UMA NOVA
PERSPECTIVA DE TRATAMENTO**

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

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani

Lima, Larissa Costa

Terapia gênica para o Alzheimer: uma nova perspectiva de tratamento / Larissa Costa Lima. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

59 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Doença de Alzheimer 2. Enzimas 3. Interferência de RNA 3. MicroRNAs 5. Terapia genética I. Lima, Fabio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.8983

Larissa Costa Lima

**TERAPIA GÊNICA PARA O ALZHEIMER: UMA NOVA PERSPECTIVA
DE TRATAMENTO**

São Paulo, 23 de maio de 2019



Professor Orientador (Fabio Mitsuo Lima)



Professor Examinador (Rodrigo Vela)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus que permitiu a realização deste trabalho mesmo diante de tantas dificuldades.

Aos meus pais pelo incentivo e apoio incondicional ao longo da graduação e que não me deixaram desistir.

A minha querida irmã Lariane que me fazia companhia no caminho para faculdade e dormia em cima de mim todos os dias e é o amor da minha vida.

Ao meu professor orientador por toda paciência e conhecimento partilhado ao longo desses semestres.

A todo corpo docente do Centro Universitário São Camilo que participaram efetivamente para minha formação e contribuíram gentilmente para formação da profissional que me tornei.

As minhas colegas de turma pelas risadas, incentivos e broncas durante esses quatro anos e aos meus amigos que tiveram que ler todas as versões deste trabalho mesmo sem entender metade do que estava escrito.

A todos muito obrigado!

Epígrafe

LIMA, Lúcia Maria de Castro, 1947

2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024

Universidade de Coimbra, Portugal

A doença da Alzheimer, a doença da memória, é a doença do esquecimento. É a perda da capacidade de recordar o passado, o presente e o futuro. É a perda da identidade, da personalidade, da consciência. É a perda da capacidade de aprender, de raciocinar, de tomar decisões. É a perda da capacidade de reconhecer pessoas e lugares. É a perda da capacidade de falar, de escrever, de ler. É a perda da capacidade de cuidar de si mesmo. É a perda da capacidade de viver.

A doença da Alzheimer é uma doença progressiva que afeta a memória e a capacidade de pensar. É causada por um acúmulo de placas e emaranhados no cérebro, o que interfere na comunicação entre as células nervosas. Não há cura para a doença, mas existem tratamentos que podem ajudar a controlar os sintomas e melhorar a qualidade de vida. É importante reconhecer os sinais e sintomas da doença e procurar ajuda médica o mais cedo possível.

A doença da Alzheimer é uma doença que afeta a memória e a capacidade de pensar.

"Vivemos da memória, que é a imaginação do que morreu; da esperança, que é a confiança no que não existe; do sonho, que é a visão do que não pode existir." (Fernando Pessoa).

"Lembre-se, é fácil esquecer para quem tem memória, difícil esquecer para quem tem coração..." (Gabriel García Márquez).

RESUMO

LIMA, Larissa Costa. **Doença de Alzheimer: Uma nova perspectiva de tratamento.** 2019. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo e devastador. É a principal causa de demência na população idosa com rápido crescimento no mundo. As características da DA são comprometimento progressivo da memória com declínio da função cognitiva, o que significa que os pacientes não podem realizar suas atividades diárias de forma independente, além de mudança de personalidade e agressividade. O crescente número de casos de DA tem impacto direto na sociedade e na economia, sendo considerado um problema de saúde pública. Apesar dos esforços dos pesquisadores para elucidar a etiologia da DA, as causas da DA permanecem parcialmente desconhecidas, e nenhum tratamento curativo está disponível ainda. As marcas patológicas da DA são placas amiloides e emaranhados neurofibrilares no cérebro com presença de tau-hiperfosforilada. Os microRNAs são pequenos RNAs não-codificantes endógenos de 22 nucleotídeos que podem regular a expressão gênica em nível pós-transcricional por degradação do transcrito ou repressão da tradução. Os microRNAs estão envolvidos em muitos processos biológicos e doenças, particularmente doenças multifatoriais. A DA é um distúrbio multifatorial, e evidências acumuladas mostram que os microRNAs desempenham um papel crítico na patogênese da DA. Nesta revisão, serão destacados os efeitos dos microRNAs como alvos terapêuticos na terapia gênica para DA.

Palavras chaves: Doença de Alzheimer, Enzimas, interferência de RNA, MicroRNAs e Terapia Gênica.

ABSTRACT

LIMA, Larissa Costa. **Alzheimer's disease: A new perspective on treatment.** 2019. 59f. Graduation in Biomedicine - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and devastating neurodegenerative disorder. It is the leading cause of dementia in the rapidly growing elderly population of the world. The characteristics of AD are progressive impairment of memory with a decline in cognitive function, which means that patients can't perform their daily activities independently, in addition to personality change and aggressiveness. The increasing number of AD cases has a direct impact on society and the economy and is considered a public health issue. Despite the efforts of researchers to elucidate the etiology of AD, the causes of AD remain partially unknown, and no curative treatment is available yet. The pathological signs of AD are amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brain with the presence of tau-hyperphosphorylated. MicroRNAs are small 22-nucleotide endogenous non-coding RNAs that can regulate gene expression at the post-transcriptional level by transcript degradation or translation repression. MicroRNAs are involved in many biological processes and diseases, particularly multifactorial diseases. AD is a multifactorial disorder, and cumulative evidence shows that microRNAs play a critical role in the pathogenesis of AD. In this work, the effects of microRNAs as therapeutic targets in the gene therapy for AD will be highlighted.

Keywords: Alzheimer's Disease, Enzymes, RNA interference, MicroRNA and Gene Therapy.

Lista de Figuras

Figura 1: Comparação entre um cérebro saudável com um cérebro acometido pela DA, com imagens de PET Scan	18
Figura 2: Representação da placa amiloide e de emaranhados neurofibrilares, corados por impregnação de prata de Bielschowsky	19
Figura 3: Diferentes regiões do cérebro, com as áreas mais afetadas pela DA destacadas em vermelho	20
Figura 4: Comparação de neurônio saudável (A) com neurônio de um paciente com Alzheimer (B).....	22
Figura 5: Esquema representativo do processamento da APP para formação de A β	23
Figura 6: Mecanismos que levam a progressão da DA.....	24
Figura 7: Principais modalidades da terapia gênica	26
Figura 8: Esquema das estratégias <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	31
Figura 9: Diferentes sistemas de entrega de genes	33
Figura 10: Representação de vetores virais utilizados em protocolos de terapia gênica.....	36
Figura 11: Distribuição gênica usando lipoplexos	37
Figura 12: Ilustração de lipossoma catiônico complexado com DNA.....	38
Figura 13: Entrega do gene baseado em dendrímeros	39
Figura 14: Mecanismos de silenciamento de genes de miRNA	42
Figura 15: Análise por Western blot dos níveis endógenos de BACE1 em células N2a695 tratadas com diferentes concentrações de pre-miR-29b, às 24, 48 e 72 h, utilizando β -actina Como normalizador	46

Lista de Gráficos

Gráfico1: Porcentagem de publicações encontradas a respeito das principais hipóteses moleculares para a DA, no período 1980-2014	21
Gráfico:2 Número de ensaios clínicos de terapia gênica aprovados em todo o mundo 1990–2017	28
Gráfico3: Distribuição geográfica dos ensaios clínicos de terapia gênica	29
Gráfico 4: Indicações abordadas pelos ensaios clínicos de terapia gênica.....	30
Gráfico 5: Vetores usados em ensaios clínicos de terapia gênica.	34
Gráfico 6: Ensaios realizados para verificar a viabilidade celular cultivadas em concentrações crescentes de CS/ pré-miR-29b (A) e PEI/ pré-miR-29b (B), por 48 e 72 horas.....	45

Listas de siglas e abreviaturas

Å - Unidade de comprimento ångström

ADA- Adenosina desaminase

ADRDA- Associação de Doença e Transtornos Relacionados a Alzheimer

AGO- Proteína Agonaute

APOE- Apolipoproteína E

APP- Proteína precursora amiloide

AVV- Adenovírus associado

A β - Beta amiloide

BACE-1- Enzima 1 do sitio de clivagem da proteína precursora amiloide, do inglês, *site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*

BHE- Barreira hematoencefálica

CS- Vetor Quitosana

DA - Doença de Alzheimer

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsRNA- RNA de dupla fita

FAD- Doença de Alzheimer familiar, do inglês, *Familial Alzheimer's Deases*

FDA - *Food and Drug admistration*

HSV-1- Herpes vírus simplex

kb- Unidade de medida kilo bases, equivale a 1000 pares de bases

kDa- Unidade de medida kilo Daltons

Mir-29- MicroRNA 29

miRNA*- MicroRNA de cadeia complementar ou passageira

miRNAs- MicroRNAs

mRNA- RNA mensageiro

ncRNA- RNA não codificante

NFTs - Emaranhados neurofibrilares

NINCDS- Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e Comunicativos e Derrame

nm- Unidade de comprimento nanômetros

PEI- Vetor Polietilenimina

PET- Tomografia por emissão de positrons

PIB – Produto Interno Bruto

piRNAs- RNAs que interagem com Piwi

pri-miRNA- MicroRNA primário

PSEN 1- Gene da Presenilina 1

PSEN 2- Gene da Presenilina 2

RISC- Complexo de silenciamento induzido por RNA, do inglês, *RNA-induced silencing complex*

RNA- Ácido ribonucleico

sAPP α - Proteína precursora solúvel alfa

sAPP β - Proteína precursora solúvel beta

SCID - Imunodeficiência combinada severa, do inglês, *Severe combined immunodeficiency*

siRNAs- pequenos RNAs de interferência

SNC- Sistema Nervoso Central

TAD - Alzheimer de início tardio

US\$ - Dólar americano (moeda dos Estados Unidos)

UTR- Região não traduzida, do inglês, *untranslated region*

α - secretase- Alfa secretase

β - secretase- Beta- secretase

γ - secretase- Gama secretase

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVO.....	16
3.METODOLOGIA.....	17
4.DESENVOLVIMENTO	18
4.1 Patogênese da Doença de Alzheimer	18
4.2 Formação do peptídeo A β	22
4.3 Proteína precursora Amiloide	24
4.4 O que é a terapia gênica?	25
4.5 Histórico da terapia gênica	26
4.6 A terapia gênica nos dias atuais.....	27
4.7 Tipos de terapia gênica	30
4.8 Vetores de transferência	31
4.8.1 Vetores virais.....	34
Retrovírus.....	34
Lentivírus.....	34
Adenovírus	35
Adenovírus associado (AAV).....	35
Herpes vírus simplex tipo 1(HSV-1)	35
4.8.2 Vetores não virais.....	36
Lipossomas	36
Polímeros catiônicos	39
Dendrímeros.....	39
Eletroporação	39
Magnetofecção.....	39
4.9 Introdução à terapia gênica no SNC	39
4.10 Os miRNAs.....	40
4.10.1 Biogênese de miRNAs	40
4.11 O uso de miRNA na terapia gênica para a doença de Alzheimer.....	43
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo psiquiatra e neurofisiologista alemão doutor Alois Alzheimer que observou alterações no tecido cerebral de uma mulher de 50 anos que faleceu decorrente de um distúrbio neurológico (BERMUDEZ, 2012). Ao descrever a doença, Alois Alzheimer observou algumas características marcantes que estão presentes até os dias atuais, como o comprometimento progressivo da memória, declínio da função cognitiva, mudança de personalidade, agressividade, entre outros. (SELKOE, 2001).

A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado por danos precoces às sinapses, com degeneração retrógrada dos axônios e eventual atrofia da árvore dendrítica que afeta amplas áreas do córtex cerebral e do hipocampo e apresenta grande relação com predisposição genética e com a senescência (SERRANO-POZO et al., 2011; SELKOE, 2001).

O aumento na expectativa de vida durante o século XX, que passou de aproximadamente 49 anos para mais de 76 anos (SELKOE, 2001), possibilitou que a doença se tornasse um dos tipos mais frequentes de demência na população idosa com impacto direto em seus familiares e sociedade, sendo considerado um problema de saúde pública. Em 2015 o custo total com tratamento de demência, em todo mundo, foi de aproximadamente US\$ 818 bilhões, o que equivale a 1,1 % do produto interno bruto (PIB) mundial com variações entre 0,2% do PIB de países de baixa e média renda a 1,4% em países de alta renda (WHO, 2017).

A demência é uma das principais causas de dependência dos idosos que são os mais afetados com este tipo de problema. Segundo dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (2017) aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem com algum tipo de demência, sendo que a doença de Alzheimer é a mais comum acometendo cerca de 60-70% dos casos. Estima-se que a até 2050 a taxa de demências registradas seja em torno de 152 milhões de pessoas com uma incidência de 10 milhões de casos por ano. No Brasil, as estimativas não são muito diferentes, pois dados indicam que a prevalência da população brasileira com mais de 65 anos passará de 7,6% para 7,9% entre 2010 e 2020 (GUTIERREZ et al., 2014).

Cerca de 90-95% dos pacientes apresentam a forma esporádica da doença, também conhecida como Alzheimer de início tardio (TAD), a qual atinge indivíduos com mais de 65 anos de idade (VEERAPPAN; SLEIMAN; COPPOLA, 2013), que está caracterizado por polimorfismos no gene *APOE* e é caracterizada pelo acúmulo de Beta amiloide ($A\beta$) seja pela produção excessiva ou pela incapacidade de se realizar a depuração deste peptídeo. Entretanto, há uma pequena porcentagem dos casos que manifesta a doença de Alzheimer familiar ou de início precoce (FAD-*Familial Alzheimer's Disease*) que está relacionada com uma mutação *missense* autossômica dominante em genes que codificam proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 e 2 (*PSEN1* e *PSEN2*), responsáveis pelo acúmulo do peptídeo amiloide $A\beta$ tóxico ($A\beta_{1-42}$) em indivíduos com menos de 65 anos de idade (MASTERS et al., 2015).

O desenvolvimento da doença está associado com acúmulo de formas insolúveis de $A\beta$ em placas neuríticas nos espaços extracelulares, bem como nas paredes dos vasos sanguíneos. A agregação da proteína tau em emaranhados neurofibrilares (NFTs) (MASTERS et al., 2015) está relacionada com as alterações do citoesqueleto decorrente da hiperfosforilação da proteína tau associada a microtúbulos, a qual normalmente está localizada no axônio. Entretanto, na DA a proteína tau é translocada para o compartimento somatodendrítico e sofre hiperfosforilação (SERRANO-POZO et al., 2011 ; DE-PAULA et al., 2012).

Estima-se que a neurodegeneração na DA comece entre 20 a 30 anos antes de qualquer manifestação clínica da doença. Muitos pacientes sobrevivem a períodos de vida completos, sofrendo por muitos anos de demência. Tal situação acarreta em altos impactos financeiros, emocionais e físicos, não apenas aos pacientes, mas também às suas famílias. Sendo assim, a necessidade de detectar e intervir clinicamente nos primeiros sinais da DA é de extrema importância (MOSCONI; MCHUGH, 2011).

Os primeiros critérios para diagnóstico de DA foram elaborados em 1984 pelo Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e Comunicativos e Derrame (NINCDS) e pela Associação de Doença e Transtornos Relacionados a Alzheimer (ADRDA), os quais eram baseados apenas na história médica, exame clínico e testes neuropsicológicos. Entretanto, em 2009, esses critérios foram revisados para

atender aos novos avanços científicos em relação a DA e passaram a incluir critérios como a falta de reconhecimento de características distintivas de outras condições de demência, de modo a excluir outras patologias neurodegenerativas, ausência de mutação nos genes *PSEN1*, *PSEN2* e *APP* e presença de alterações evidenciadas pelos exames de imagem como tomografia por emissão de pósitrons (PET) (MCKHANN et al., 2011).

Apesar de grandes avanços no diagnóstico da DA ainda não é possível confirmar definitivamente a doença *in vivo*, apenas a neuropatologia, considerada padrão ouro, realizada *post-mortem* é capaz de revelar as lesões patológicas específicas: placas beta amilóide no espaço extracelular e vasos sanguíneos, emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs), perda neuronal e sináptica em regiões específicas do cérebro (MOSCONI; MCHUGH, 2011).

Com o avanço das pesquisas relacionadas com a DA medicamentos como os inibidores de acetilcolinesterase (cloridrato de donepezila, rivastigmina, galantamina, huperzina-A) e antagonista de *N*-metil-D-aspartato (memantina) foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar pacientes diagnosticados com DA. Entretanto, estes medicamentos não apresentam eficácia na progressão do declínio cognitivo, sendo capazes apenas de fornecer alívio sintomático de curto prazo (VEERAPPAN; SLEIMAN; COPPOLA, 2013).

A terapia gênica surgiu como uma alternativa às abordagens farmacológicas tradicionais, pelos avanços importantes na última década no tratamento do sistema nervoso, por meio do desenvolvimento de diversas maneiras de entregar genes ao Sistema Nervoso Central (SNC) (HOCQUEMILLER et al., 2016). Sendo assim, a terapia gênica constitui-se em uma potencial estratégia para o tratamento da DA por melhorar diretamente a ação de enzimas relacionadas com a degradação de A β , entre outras funções (NILSSON et al., 2010). Além disso, a terapia gênica com a utilização de RNAs não codificantes (ncRNAs) pode ser mais econômica e conveniente, uma vez que proporciona maior direcionamento e durabilidade do efeito terapêutico (CACABELOS, TORRELLAS, 2014).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é elucidar os pontos importantes na doença de Alzheimer com ênfase nas alterações genéticas que acometem seus pacientes e propor alvos para realização de terapia gênica com intuito de melhorar a qualidade de vida daqueles que desenvolveram a doença, principalmente em idade precoce.

3. METODOLOGIA

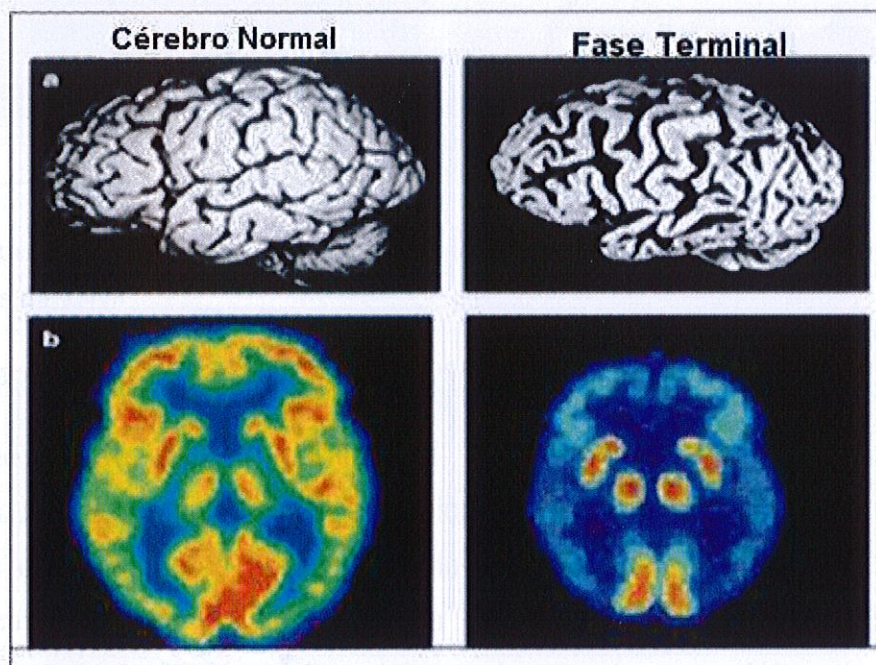
Para realização deste trabalho foram utilizados artigos científicos consultados em bases de dados como PubMed e revista eletrônica Scielo. Também foi pesquisado em sites de busca mais amplos, como Google Acadêmico e Bireme, nos idiomas português e inglês em arquivos publicados durante os anos de 1990 a 2019.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Patogênese da Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é um distúrbio neurodegenerativo progressivo, caracterizada pela perda crônica de neurônios e sinapses responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral, além de apresentar aumento dos ventrículos cerebrais, caracterizado pelo alargamento dos sulcos, como pode ser observado na figura 1 (ALVES et al., 2012; OLIVEIRA FILHO; MARTINS, 2018).

Figura 1: Comparação entre um cérebro saudável com um cérebro acometido pela DA, com imagens de PET Scan.



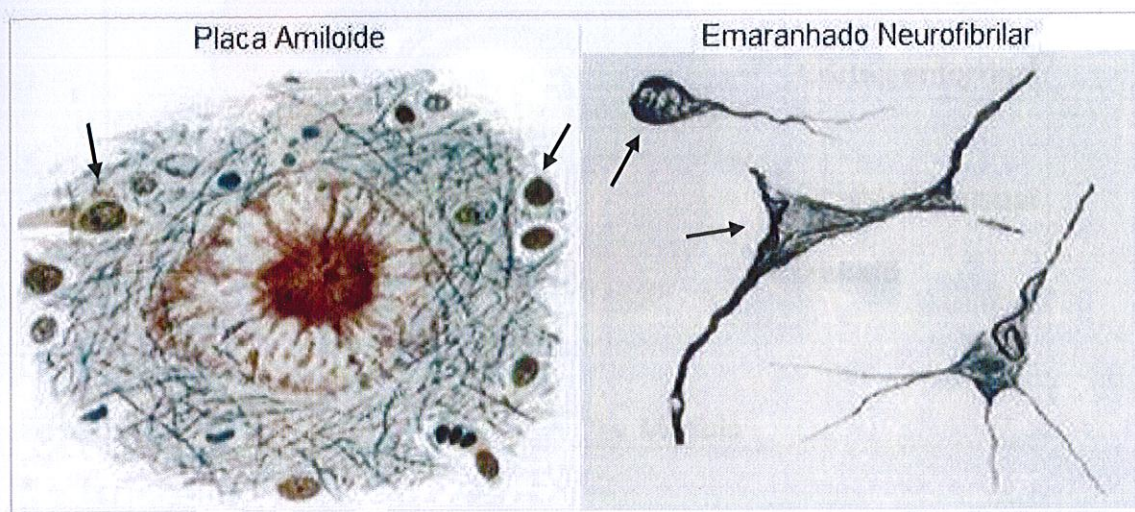
Nota: Alterações anatômicas da doença de Alzheimer. Comparação entre um cérebro saudável ou não acometido pela DA (à esquerda) e um cérebro acometido pela DA (à direita).

Fonte: (OLIVEIRA FILHO; MARTINS, 2018).

O substrato neuropatológico da doença de Alzheimer é a presença de placas amiloides nos espaços extracelulares e nas paredes dos vasos e emaranhados neurofibrilares, bem como as perdas sinápticas, degeneração neuronal (apoptose), infiltrado inflamatório e angiopatia amiloide. As placas senis são depósitos extracelulares esféricos de agregados insolúveis de $A\beta_{42}$ localizadas, inicialmente,

no sistema límbico. Os emaranhados neurofibrilares são agregados intracitoplasmáticos de filamentos helicoidais pareados, compostos pela proteína Tau hiperfosforilada (Figura 2) (TORRES et al., 2012).

Figura 2: Representação da placa amiloide e de emaranhados neurofibrilares, corados por impregnação de prata de Bielschowsky.

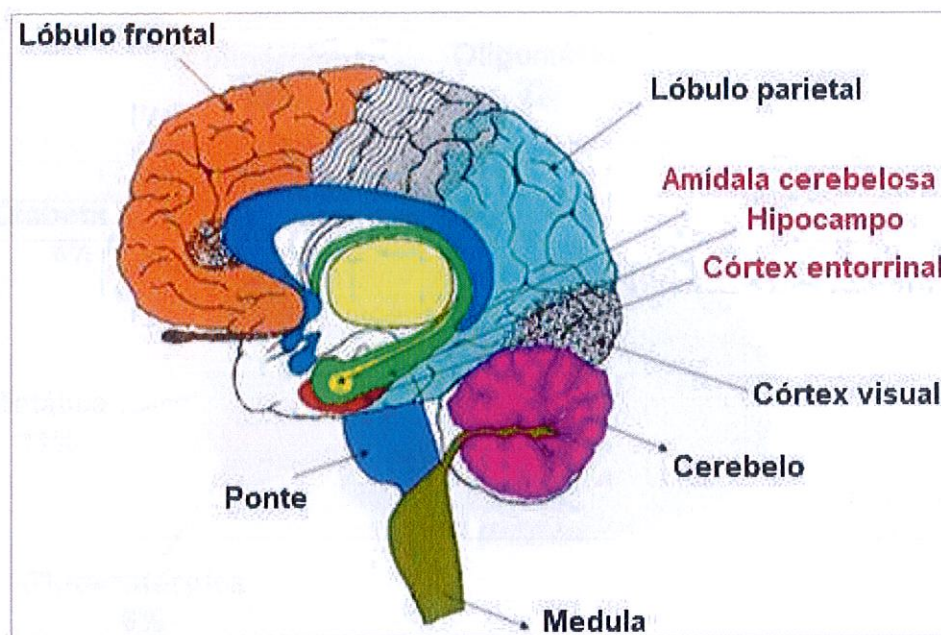


Nota: As setas mostram as proteínas agregadas que constituem as placas extracelulares e os emaranhados neurofibrilares.

Fonte: Adaptado de (MASTERS et al., 2015).

A deposição de A β geralmente antecede as alterações neurofibrilares localizadas, inicialmente, no sistema límbico (hipocampo, córtex entorrinal, amígdala cerebelosa e em algumas áreas corticais e subcorticais) (TORRES et al., 2012), como mostra a figura 3, enquanto as porções parietais e frontais do córtex associativo são afetadas na fase avançada da doença. Além das alterações histopatológicas, alterações bioquímicas como estresse oxidativo, neuroinflamação, desregulação de cálcio e homeostase metálica também são observadas na doença (FALCO et al., 2016; ALVES et al., 2012).

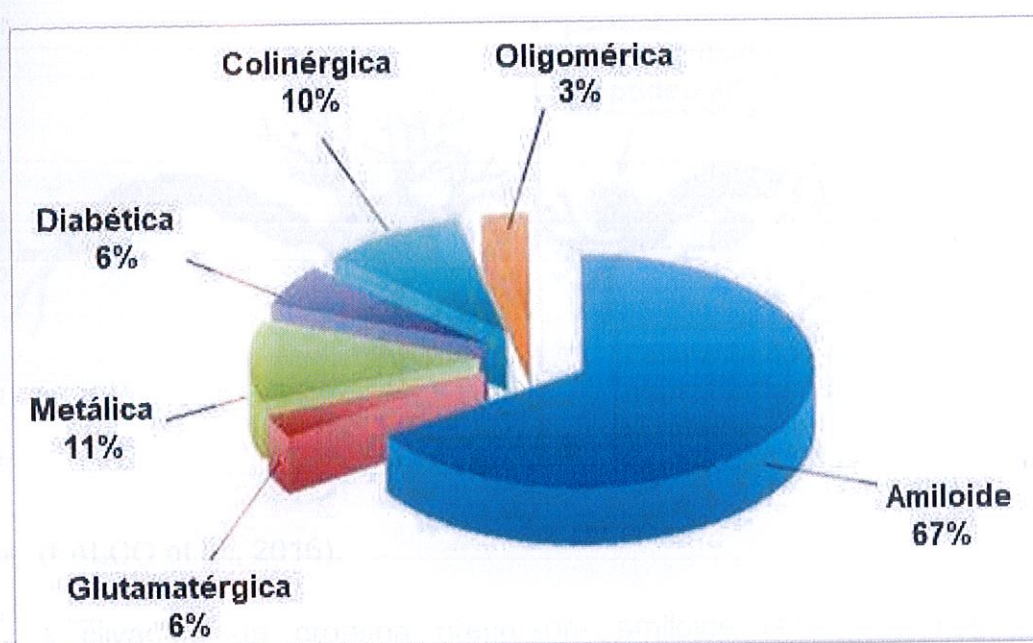
Figura 3: Diferentes regiões do cérebro, com as áreas mais afetadas pela DA destacadas em vermelho.



Fonte: (FALCO et al., 2016).

Diversas teorias foram formuladas para explicar a patogênese do Alzheimer. Entretanto, nenhuma delas é capaz de abordar todos os aspectos da doença. A teoria da cascata amiloide é a mais estudada nos dias atuais, como demonstrado no gráfico 1. Foi proposta pela primeira vez por Hardy e Allsop em 1991 (FALCO et al., 2016; CARRILLO-MORA; LUNA; COLÍN-BARENQUE, 2014), sugerindo que a DA seja deflagrada por excesso de produção, deposição e agregação da proteína $A\beta_{40/42}$, levando à disfunção neuronal, oxidação, excitotoxicidade e neuroinflamação responsáveis pela apoptose. O resultado, decorrido da morte neuronal, é o déficit na neurotransmissão colinérgica, serotoninérgica, dopaminérgica e noradrenérgica, com predomínio da disfunção colinérgica (TORRES et al., 2012).

Gráfico1: Porcentagem de publicações encontradas a respeito das principais hipóteses moleculares para a DA, no período 1980-2014.

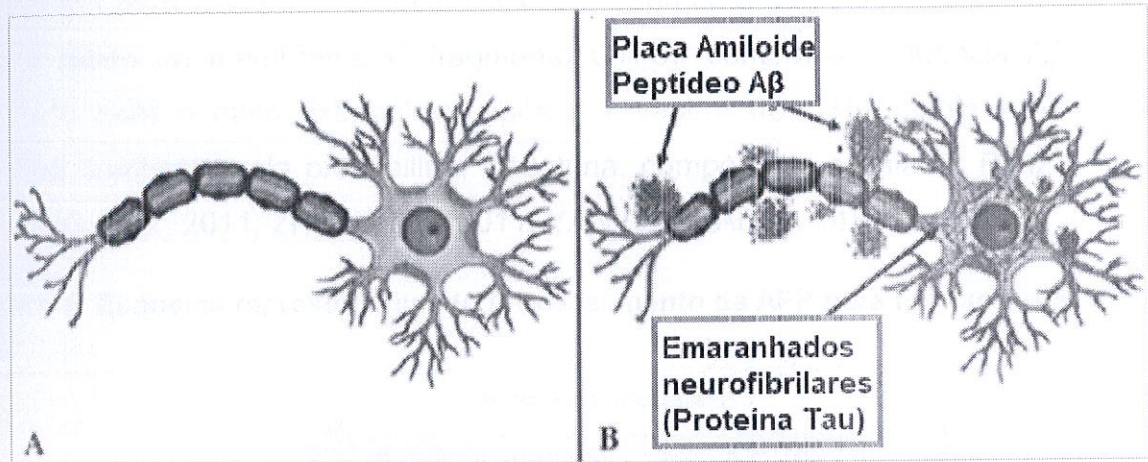


Fonte: (FALCO et al., 2016).

Segundo a teoria da cascata amiloide, a excessiva formação e deposição de A β fibrilar insolúvel, com conseqüente agregação em placas senis resultando numa cascata neurotóxica, é o evento iniciador na patogênese da DA em conseqüência da alteração dos processos fisiológicos que alteram a clivagem proteolítica da APP e que, associado com a hiperfosforilação da proteína tau, é responsável pela disfunção sináptica, inflamação, perda neuronal e demência, favorecendo o processamento amiloidogênico (FALCO et al., 2016; DE-PAULA et al., 2012; ALVES et al., 2012).

Os sintomas da DA associados às lesões são decorrentes de agregados anormais de fibras citoplasmáticas que ocorrem nos neurônios envolvendo os emaranhados neurofibrilares, sendo chamados de neurites distróficas. A figura 4 apresenta as diferenças entre um neurônio saudável e um neurônio de um paciente com DA (FALCO et al., 2016).

Figura 4: Comparação de neurônio saudável (A) com neurônio de um paciente com Alzheimer (B).



Fonte: (FALCO et al., 2016).

A clivagem da proteína precursora amiloide (APP), uma glicoproteína transmembranar do tipo I, por γ e β -secretases originam um grupo heterogêneo de peptídeos de comprimento variável, A β 40 e A β 42 respectivamente. O peptídeo A β 42 é menos solúvel e tem propriedades agregativas aumentadas em relação a A β 40, formando, conseqüentemente, as placas insolúveis neurotóxicas resultando em morte celular (WILEY et al., 2005; FALCO et al., 2016).

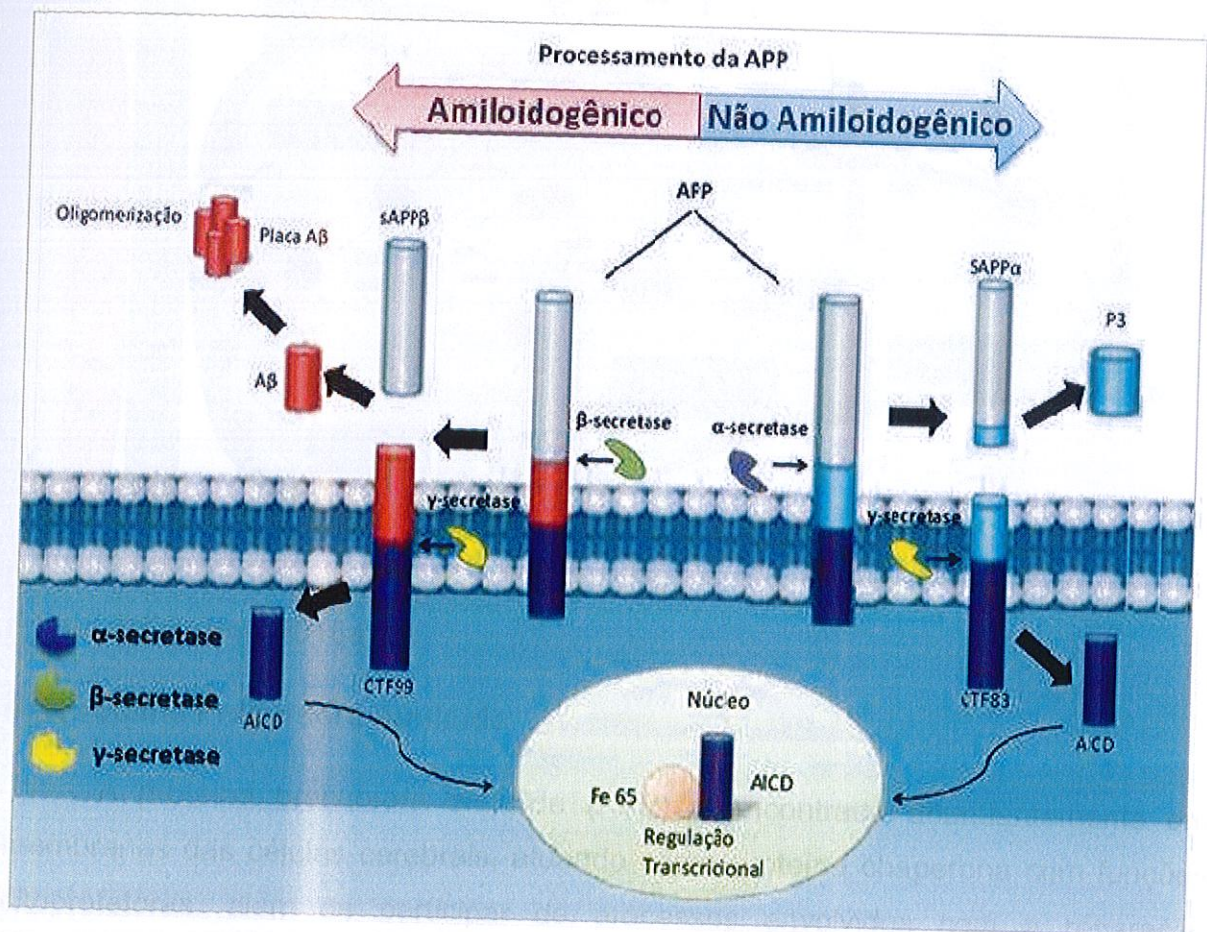
4.2 Formação do peptídeo A β

A produção do peptídeo A β ocorre a partir do processamento da APP, a qual é sintetizada no retículo endoplasmático e, posteriormente, é transportada por meio do aparelho de Golgi em vesículas secretoras até a superfície celular de neurônios. Em seguida, é clivada pela α -secretase originando um fragmento neuroprotetor solúvel denominado sAPP α , que é secretado para o meio extracelular e um fragmento que fica retido na membrana celular, o qual será posteriormente clivado pela γ -secretase formando o fragmento denominado p3 (ZHANG et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

Na via não amiloidogênica não ocorre a produção de A β , uma vez que a sequência responsável por traduzir o peptídeo A β está dentro do sítio de clivagem da α -secretase (Figura 5) (ZHANG et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

Na via amiloidogênica (Figura 5), a APP é clivada inicialmente por β -secretase, produzindo uma forma longa e solúvel de APP sAPP β , que será secretada para o espaço extracelular e um fragmento carboxi-terminal CTF99 que ficará retido na membrana. O fragmento CTF99 contém a sequência A β que é liberado para o meio extracelular após a clivagem de CTF99 pela γ -secretase, enzima composta pela presenilina, nicastrina, componente regulador Pen2 e Aph1 (ZHANG et al., 2011; ZHOU et al., 2011; YAN; VASSAR, 2014).

Figura 5: Esquema representativo do processamento da APP para formação de A β .



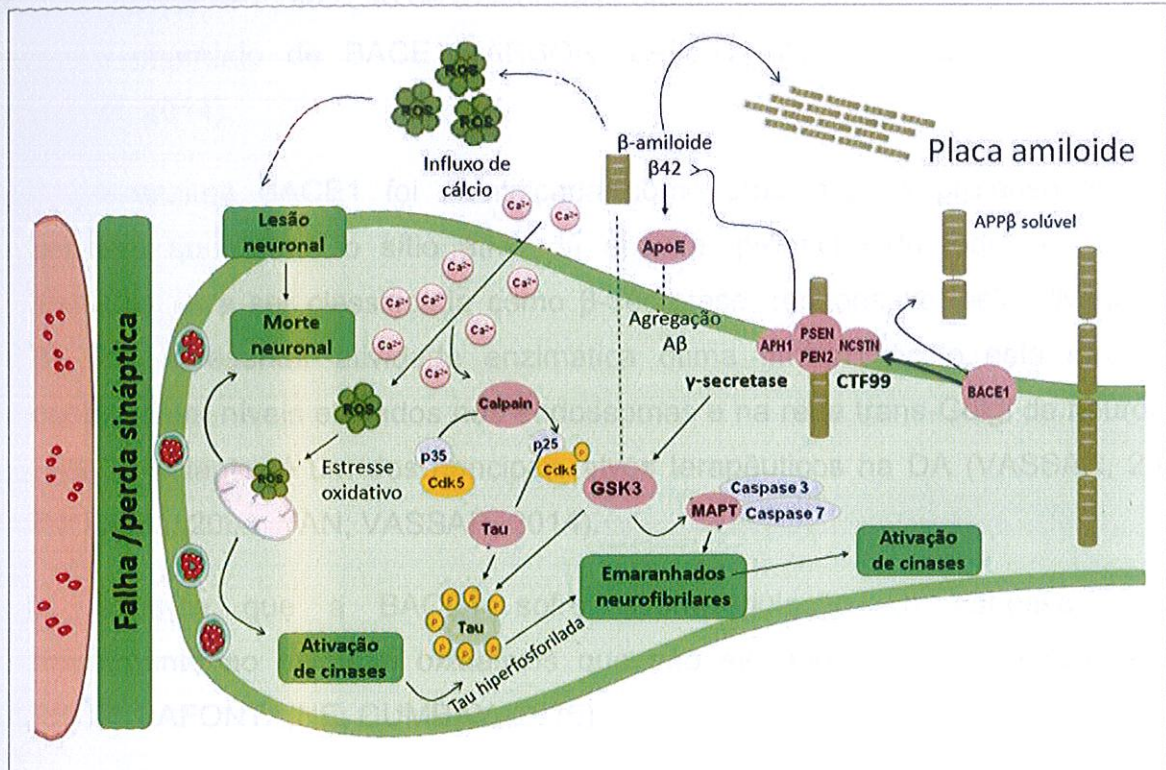
Nota: A via de processamento de APP não-amiloidogênica (direita) envolve clivagens proteolíticas por secretases α e γ resultando na geração de fragmentos de sAPP α carboxi-terminal incluindo P3, CTF83 e AICD. A via amiloidogênica de processamento de APP (esquerda) envolve clivagens proteolíticas pelas secretases β e γ resultando na geração de fragmentos sAPP β e carboxi-terminal incluindo A β , CTF99 e AICD. Os peptídeos A β podem oligomerizar e fibrilar levando à AD.

Fonte: Adaptado de (ZHOU et al., 2011).

Além das características histopatológicas descritas acima, outras alterações comuns presentes na DA incluem transporte axonal comprometido e plasticidade

sináptica reduzida. Os mecanismos que afetam a progressão da DA envolvem desregulação de várias vias celulares como demonstrado na Figura 6 (PEREIRA, 2016a).

Figura 6: Mecanismos que levam a progressão da DA



Fonte: (PEREIRA, 2016a).

4.3 Proteína Precursora Amiloide

A proteína precursora amiloide (APP) é encontrada abundantemente em membranas das células cerebrais, atuando como proteína chaperona com funções citoprotetoras, além de participar de processos envolvidos com a reparação sináptica e sinalização celular (AASETH et al., 2016).

O gene APP localizado no cromossomo 21q21.1 - 21q21.3 é responsável por codificar a proteína precursora amiloide, a qual sofre splicing alternativo gerando as três principais isoformas APP695, APP751 e APP770. (ZHANG et al., 2011). No mínimo 39 mutações no gene APP que afetam seu processamento e, conseqüentemente, aumentam a produção de A β , já foram identificados,

correspondendo a aproximadamente 16% dos casos de FAD (BASAVARAJU; LENCASTRE, 2016).

Mutações na APP apresentam correlação positiva com a produção de A β na forma de A β 40, A β 42 ou ambos, por meio de um dos três mecanismos: expressão aumentada de APP, inibição de α -secretase ou atividade aumentada de β -secretase, também chamado de BACE1 (ARBOR; LAFONTAINE; CUMBAY, 2016; YAN; VASSAR, 2014).

A enzima BACE1 foi identificada como uma aspartil protease ligada à membrana que forma o sítio ativo da enzima, preenchendo todos os critérios conhecidos para ser classificada como β -secretase, responsável pela clivagem da APP. Por apresentar atividade enzimática ótima em pH ácido esta enzima é encontrada em níveis elevados nos endossomas e na rede trans-Golgi de neurônios do SNC. Portanto, é um dos principais alvos terapêuticos na DA (VASSAR, 2016; OHNO et al., 2004; YAN; VASSAR, 2014).

Sabe-se que a BACE1 sofre suprarregulação ao estresse celular, principalmente ao estresse oxidativos que são elevados em pacientes com DA (ARBOR; LAFONTAINE; CUMBAY, 2016).

A *BACE1* quando superexpressa irá clivar a APP e, conseqüentemente, aumentar a produção de A β (VASSAR, 2016; OHNO et al., 2004). Foi comprovado que a diminuição da β -secretase melhora os déficits de memória e reduz os níveis de A β . Sendo assim, o gene da *BACE1* é um potencial alvo terapêutico para DA (OHNO et al., 2006).

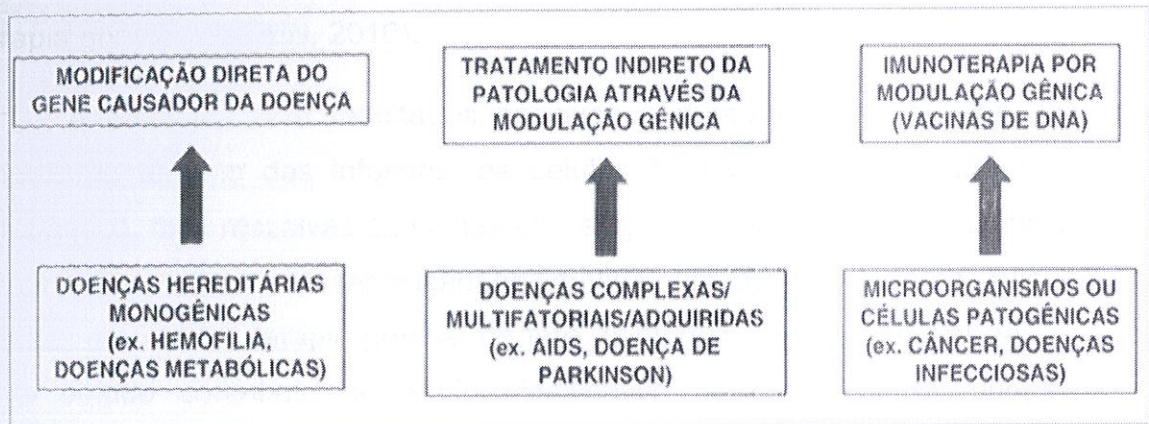
4.4 O que é a terapia gênica?

A terapia gênica tem como definição a inserção de material genético sadio em uma célula, através de técnicas de DNA recombinante, com intuito de interferir na progressão de uma doença, seja manipulando, substituindo ou suplementando genes inativos ou disfuncionais (LINDEN, 2010).

As doenças genéticas são causadas por alterações em genes, levando à expressão de um produto não funcional ou com função reduzida. Logo, o conhecimento da função do gene e as conseqüências de uma alteração são

fundamentais para o uso de técnicas de biologia molecular que podem alterar o quadro clínico do paciente, ora modificando a expressão de um gene mutado, ora estimulando sistemas de reparo ou regeneração, ou ainda modulando genes que não estejam associados à causa da doença (FÉCCHIO; MACEDO; RICC, 2015).

Figura 7: Principais modalidades da terapia gênica



Fonte: (LINDEN, 2010).

4.5 Histórico da terapia gênica

As descobertas sobre a estrutura, natureza e bioquímica do DNA a partir de 1940, gerou grandes expectativas quanto à manipulação do material genético. Mesmo antes do conhecimento sobre DNA recombinante os cientistas já eram capazes de manusear o material genético bacteriano. Entretanto, foi apenas em 1960 que cientistas cogitaram a ideia de utilizar vírus como agentes modificadores do DNA em doenças genéticas (LINDEN, 2010; FÉCCHIO; MACEDO; RICC, 2015).

Desde então surgiram vários estudos relacionados à terapia gênica. Entretanto, apenas em 1990 o *FDA* aprovou o primeiro teste, realizado em uma menina de quatro anos que apresentava uma doença genética que resulta na deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA). Tal doença estava relacionada com o desenvolvimento do sistema imune, impossibilitando que a paciente pudesse ter uma vida normal. A deficiência de ADA é uma imunodeficiência combinada severa (SCID) que resulta em degeneração de células T. Geralmente, essa imunodeficiência é controlada por reposição enzimática. Entretanto, a criança desenvolveu alergia contra as injeções de reposição enzimática (LINDEN, 2010).

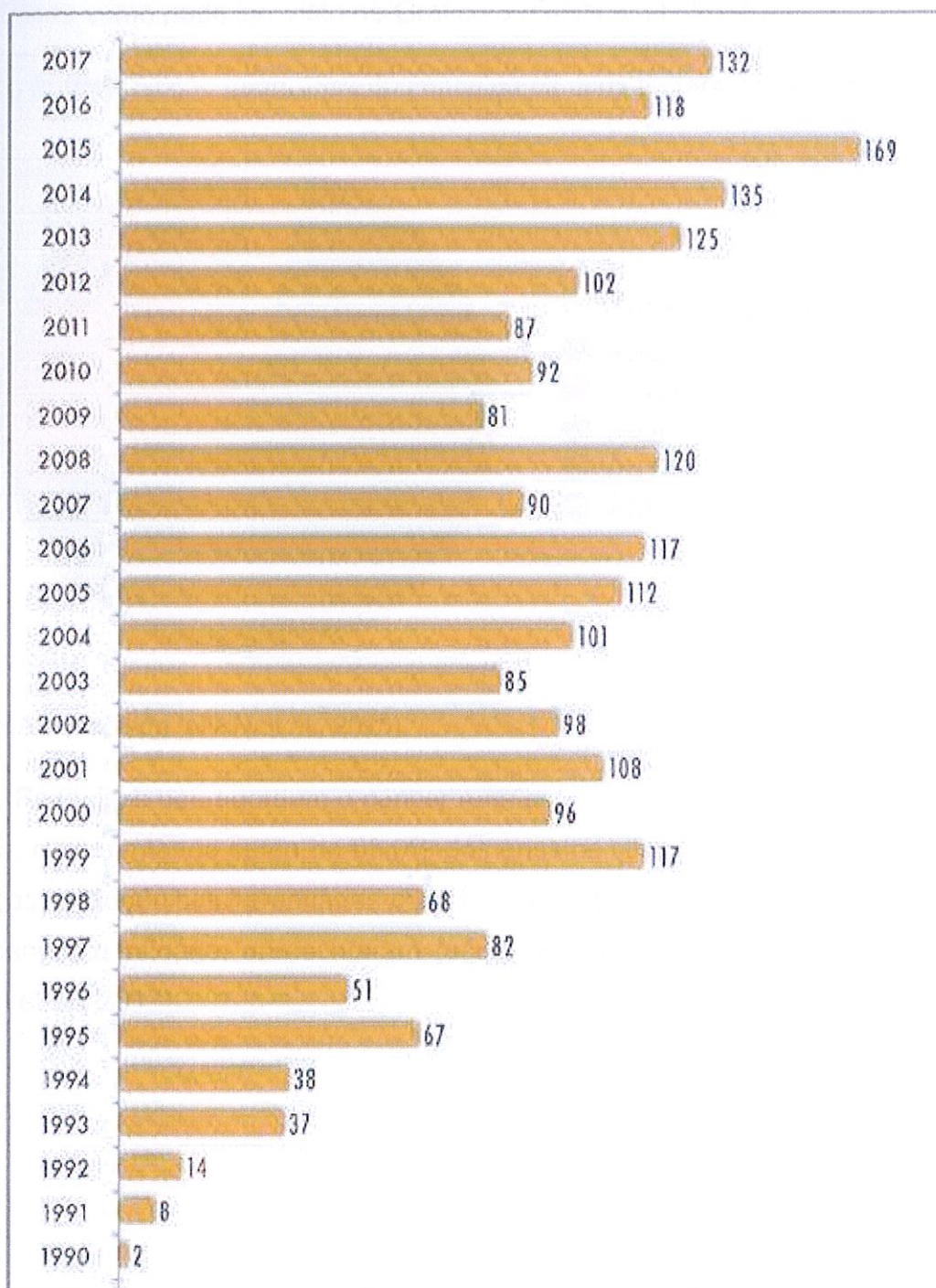
O médico William French Anderson, iniciou a terapia gênica na paciente seguindo um protocolo de pesquisa que se baseava no isolamento de células T do sangue da paciente em cultura e, por meio de um vetor viral, infectava as células com cópias do gene saudável. Em seguida reintroduzia as células com o gene terapêutico na paciente. Esse processo se repetiu em intervalos determinados e as injeções de ADA continuaram a serem ministradas semanalmente em paralelo com a terapia gênica (LINDEN, 2010).

A pesquisa teve resultados positivos e duradouros, pois após doze anos depois do término das infusões, as células T continuavam a expressar o gene terapêutico, mas ressalvas são feitas em relação a este estudo, pois como a criança continuou recebendo a reposição enzimática, em doses menores, não se pode afirmar o quanto a terapia gênica, de fato, contribuiu para a melhora dos sintomas. Este estudo contribuiu de modo significativo para que outros pudessem ser realizados e hoje a terapia para ADA é um sucesso clínico (LINDEN, 2010).

4.6 A Terapia Gênica nos dias atuais

Com o sucesso observado na década de 90 com a terapia para SCID, os pesquisadores viram a terapia gênica como uma ferramenta viável para o tratamento para várias doenças e, desde então, o número de trabalhos publicados envolvendo estudos de transferência de genes aumentou significativamente como pode ser visto no Gráfico 2 (GINN et al., 2018). Entretanto, houve um decréscimo de casos entre os anos de 1999 e 2003 em consequência de um caso, geralmente não fatal, utilizando um vetor adenovírus recombinante que culminou na morte de um paciente (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010).

Gráfico:2 Número de ensaios clínicos de terapia gênica aprovados em todo o mundo 1990–2017.

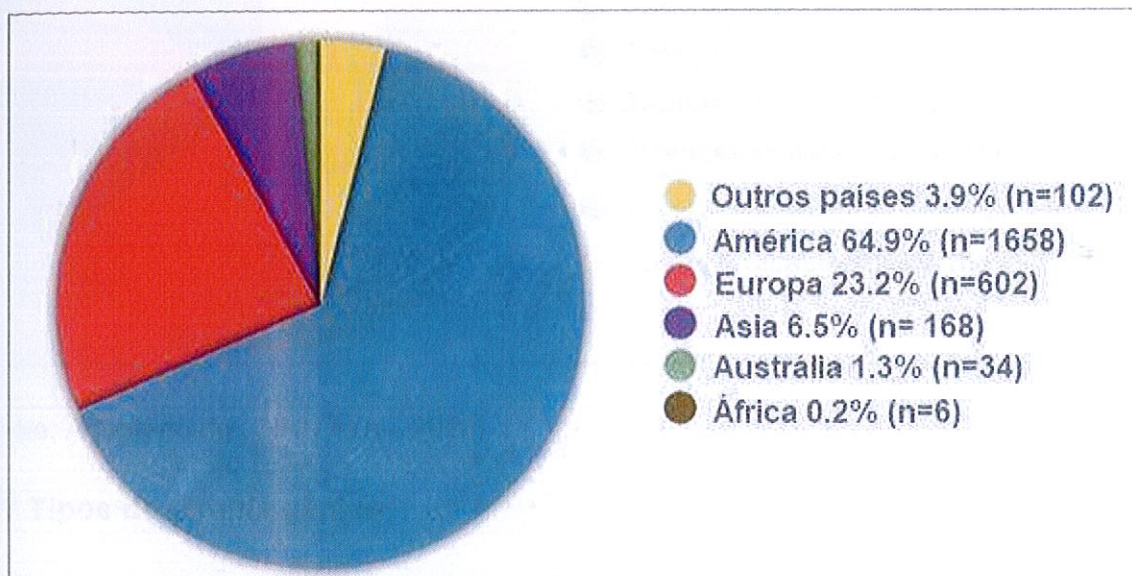


Fonte: (GINN et al., 2018).

Os ensaios clínicos de terapia gênica estão sendo realizados nos cinco continentes, abrangendo 38 países. A distribuição continental dos estudos reflete os gastos com pesquisa e desenvolvimento, sendo que 64,9% dos estudos são

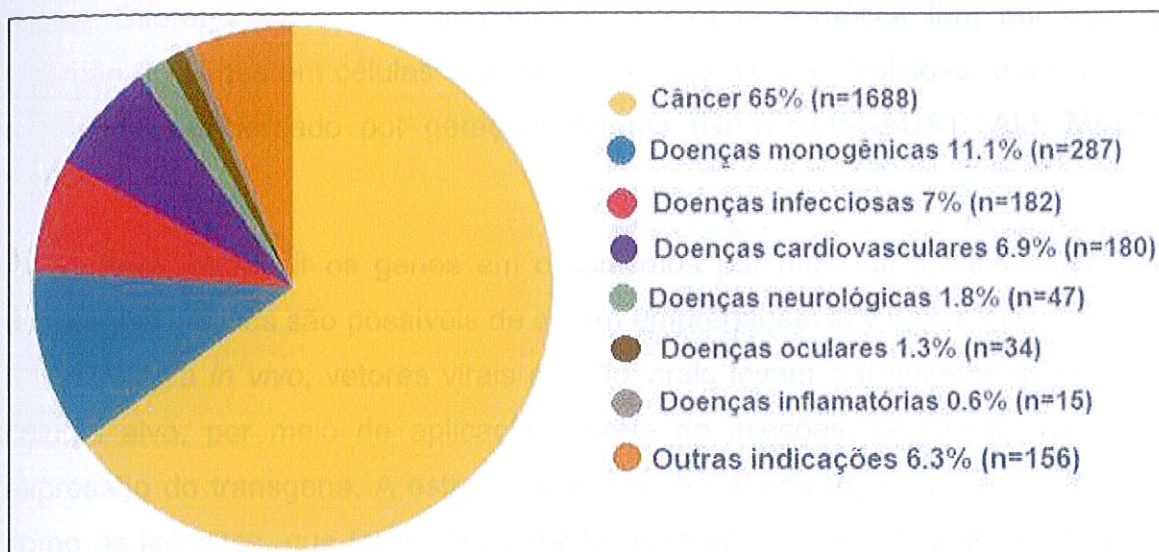
realizados nas Américas, 23,2% na Europa e, na Ásia, as pesquisas em terapia gênica atingem 6,5%. Outros países ainda apresentam poucos estudos em andamento como pode ser visto no Gráfico 3 (GINN et al., 2018).

Gráfico 3: Distribuição geográfica dos ensaios clínicos de terapia gênica.



Fonte: Adaptado de (GINN et al., 2018).

Pesquisas que abordam o câncer refletem a maioria das indicações de terapia gênica, representando cerca de 65,0% dos ensaios clínicos, seguido por estudos de doenças monogênicas hereditárias com 11,1% sendo que este último, mesmo sendo em menor quantidade, apresentaram resultados mais promissores até o momento (GINN et al., 2018).

Gráfico 4: Indicações abordadas pelos ensaios clínicos de terapia gênica

Fonte: Adaptado de (GINN et al., 2018).

4.7 Tipos de terapia gênica

A terapia gênica consiste em introduzir um gene de interesse, ou seja, o transgene, o qual possui uma sequência determinada e conhecida possibilitando a expressão de proteínas essenciais ou inibindo a expressão de proteínas que, de outro modo, seriam nocivas. Assim, com a terapia gênica, há a possibilidade de corrigir deficiências hereditárias ou adquiridas (NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012).

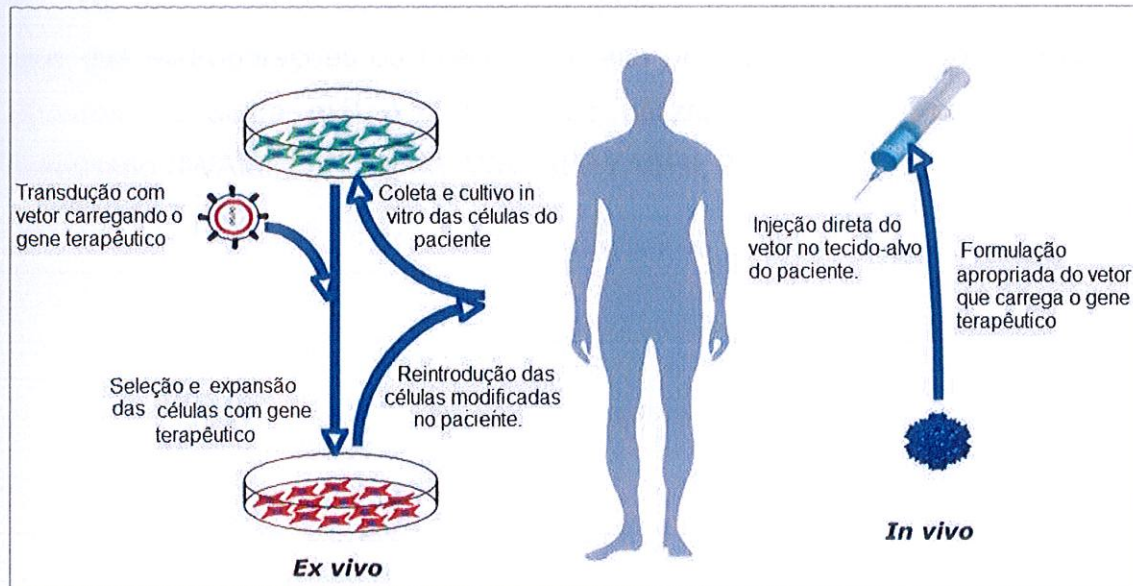
O silenciamento genético por meio de pequenas moléculas de RNA não codificante que degradam o RNAm ou bloqueiam a síntese proteica, é um modelo de terapia gênica desenvolvido no final da década de 1990, tendo como base um mecanismo natural usado pelos organismos vivos para regular negativamente a expressão de determinado gene no nível pós transcricional. Atualmente são conhecidas diversas famílias de RNA envolvidas nesses mecanismos dentre eles: os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e os RNAs que interagem com Piwi (piRNAs) (JÚNIOR et al., 2016).

Existem dois tipos de terapia gênica, sendo elas a terapia gênica germinal e a somática. A primeira consiste na inserção do transgene em células germinativas, com efeito terapêutico podendo ser visto tanto no indivíduo tratado quanto em seus

descendentes. Entretanto, a aplicação deste tipo de terapia é proibida por razões éticas. Diferente da terapia germinativa, a terapia somática tem por objetivo a inserção de genes em células somáticas, ou seja, células diploides, e sendo assim, não pode ser herdado por gerações futuras (NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012).

Para introduzir os genes em organismos por meio de terapia gênica, duas estratégias básicas são possíveis de serem empregadas: *in vivo* e *ex vivo* (Figura 8). Na estratégia *in vivo*, vetores virais ou não virais levam o transgene diretamente a células alvo, por meio de aplicações direta de injeções, resultando na eficiente expressão do transgene. A estratégia *ex vivo* baseia-se na modificação de células, como os linfócitos, que foram previamente retirados de um paciente e cultivadas *in vitro*. Essas células selecionadas, após tratamento *in vitro* serão reintroduzidas no paciente e, desta forma, irão expressar o gene exógeno desejado (MENCK; VENTURA, 2007).

Figura 8: Esquema das estratégias *in vivo* e *ex vivo*.



Fonte: Adaptado de (MENCK; VENTURA, 2007).

4.8 Vetores de transferência

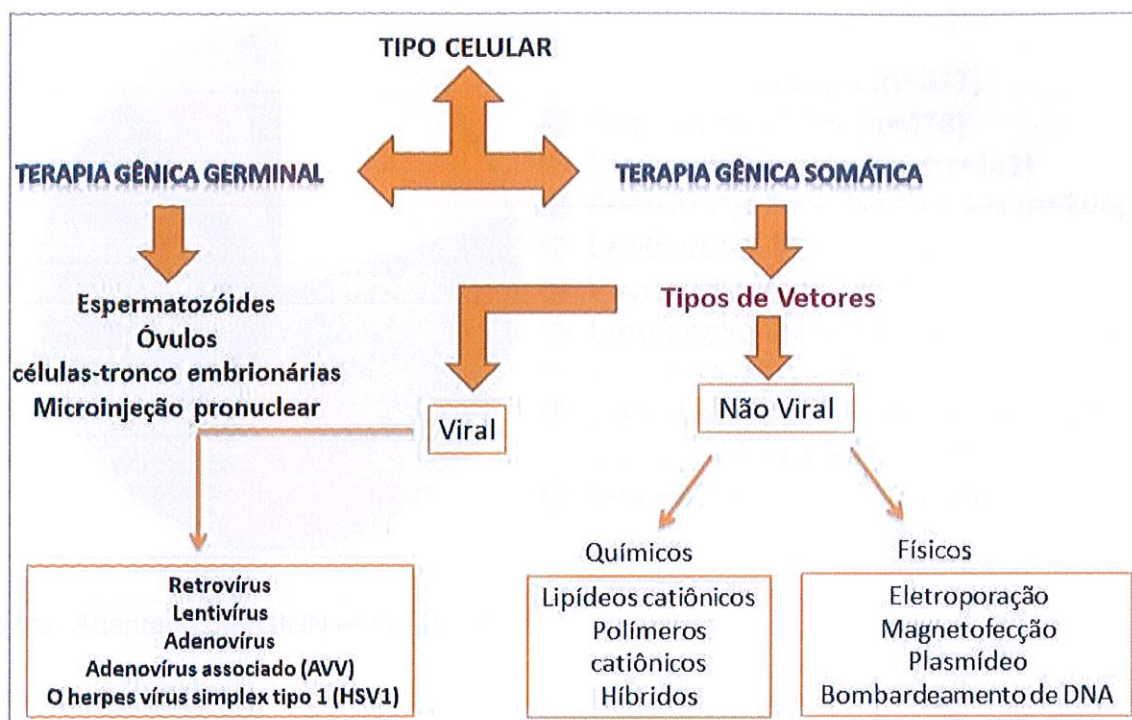
O termo transferência gênica se refere a qualquer procedimento que vise a entrada, por meio de vetores (do latim *vector*, que significa “aquele que entrega”), de material genético, seja na forma de DNA, RNA ou ainda oligonucleotídeos em

células alvo. A escolha do vetor ideal deve seguir alguns critérios como: apresentar alta eficiência de transdução, especificidade para célula alvo, apresentar um perfil de segurança aceitável e deve ser capaz de expressar o transgene por um período de tempo adequado (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010), além de ser capaz de acomodar o gene de interesse, cujo tamanho é variável. Apresentar baixa imunogenicidade e citotoxicidade deve apresentar a expressão estável do transgene, baixo custo, fácil produção e manipulação e ainda possibilidade de regular a expressão do gene exógeno no tempo e/ou em quantidades adequadas (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

As características físico-químicas das membranas biológicas não permitem a passagem de ácidos nucleicos de maneira natural. Logo, o DNA exógeno deve atravessar a membrana celular e atingir o núcleo da célula alvo onde irá ocorrer a expressão do gene. Além do obstáculo físico da membrana, o DNA tem que resistir à degradação por nucleases presente nas células. Sendo assim, o uso de vetores para a entrega de DNA exógeno é imprescindível (KAMIMURA et al., 2011).

Há vários meios de transferência gênica, que podem ser físicos como nos casos das eletroporações ou injeções de alta pressão, químicos tais como uso de polímeros ou ainda métodos biológicos utilizando os vírus como vetores de transmissão (IWAMI; NATSUME; WAKABAYASHI, 2011).

Figura 9: Diferentes sistemas de entrega de genes



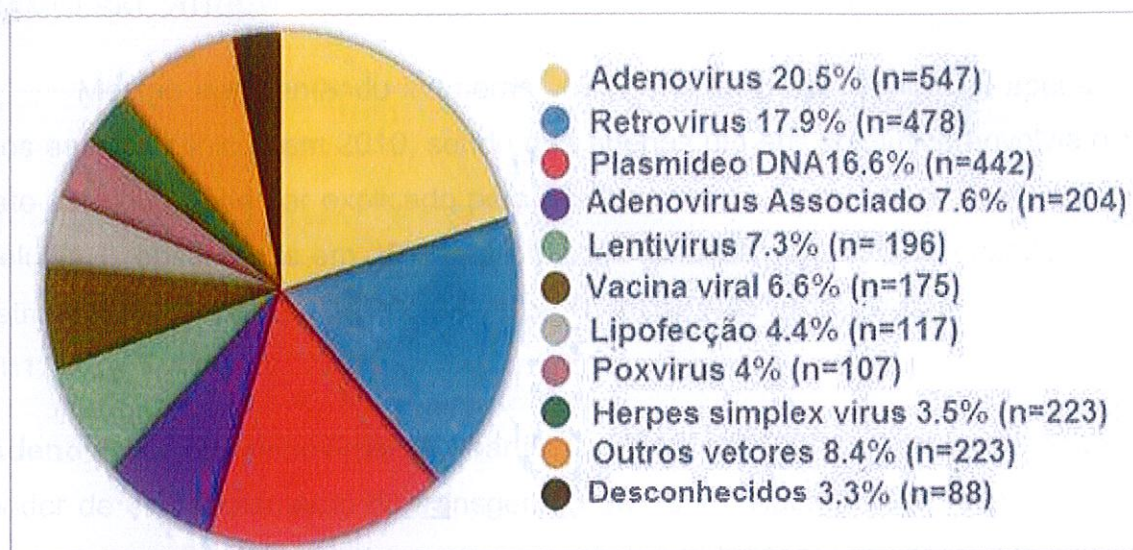
Fonte: Adaptado de (NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012).

A forma plasmidial consiste no tipo de material genético utilizado nas transferências gênicas, na qual um gene de interesse é inserido em um plasmídeo de expressão, estimulando a síntese da proteína funcional desejada (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

Além da forma plasmidial, existe a forma viral que também é muito utilizado em experimentos de transferência, e nestes vetores virais, o gene de interesse substitui regiões gênicas de alguns vírus que geralmente são responsáveis pela sua patogenicidade e, deste modo, os vírus são incapazes de causar dano ao hospedeiro (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

Uma série de vetores foram desenvolvidos ao longo dos anos. Atualmente, diversas são as formas de entrega do material genético à célula alvo e mesmo com as diversas vantagens que os vetores não virais apresentam, eles ainda são pouco utilizados na pesquisa em comparação com os vetores virais, como demonstrado no Gráfico5 (GINN et al., 2018).

Gráfico 5: Vetores usados em ensaios clínicos de terapia gênica.



Fonte: Adaptado de (GINN et al., 2018).

4.8.1 Vetores virais

Os vírus estão entre os mais simples agentes biológicos com a capacidade intrínseca de fornecer material genético às células, sendo este um dos principais motivos que os tornam ótimos vetores para transferência genética. Os lentivírus, herpes vírus simplex (HSV-1), adenovírus e adenovírus associado (AVV), são comumente usados na entrega de material genético ao SNC promovendo, eficazmente, a cura de doenças (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013; LENTZ; GRAY; SAMULSKI, 2012).

Retrovírus: são vírus RNA de cadeia simples, com capacidade de transportar um transgene de até 8kb, utilizando a transcrição reversa para produzir DNA, que é inserido de forma aleatória em células quiescentes do SNC e confere expressão gênica em longo prazo (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Além disso, os retrovírus têm a capacidade de inserir o DNA exógeno no cromossomo de células em divisão assegurando a transmissão fiel do transgene nas células filhas (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Lentivírus: são retrovírus complexos e sendo assim fazem parte da gama dos vetores virais envelopados, que possuem a capacidade de armazenar DNA exógeno de até 9kb. Os lentivírus apresentam a capacidade de infectar células não

replicativas e proliferativas como as células neuronais (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010).

Mesmo apresentando inúmeras vantagens eles representavam apenas 1,5% dos ensaios clínicos em 2010, sendo que apenas um ensaio clínico envolvia o SNC, fato este que pode ser explicado pela alta taxa de desenvolvimento de leucemia de células T, observados em 20% das crianças tratadas para (SCID) usando um vetor retroviral (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010; NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012).

Adenovírus: os adenovírus são partículas virais de 100 nm não envelopados cujo poder de empacotamento do transgene é de 36 kb. Apesar de apresentar tropismo neuronal o uso deste vetor na terapia gênica é limitado devido à alta toxicidade observada (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010).

Adenovírus associado (AAV): Apresentam a capacidade de transportar material exógeno de até 4,7kb. O uso destes vetores representa cerca de 7,6% dos ensaios clínicos, sendo que destes aproximadamente 20% estão direcionados ao desenvolvimento da terapia gênica para doenças neurodegenerativas (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010).

A grande vantagem de se utilizar o AAV é o baixo risco de infecções patogênicas, pois são dependentes de uma co-infecção, geralmente com adenovírus para realizar o ciclo lítico (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

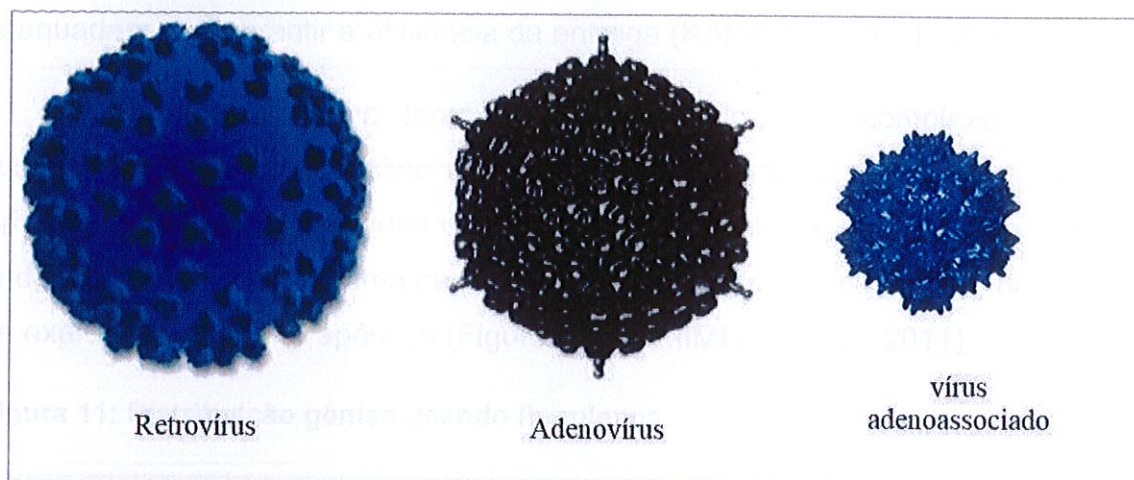
Herpes vírus simplex tipo 1(HSV-1) são partículas virais de 100 nm que permite o empacotamento do transgene com tamanho aproximado de 100 kb (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010).

O HSV-1 tem como principal vantagem o neurotropismo natural via transporte axonal retrógrado (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010) além de ser capaz de manifestar alta eficiência de transdução e sua capacidade de entrar em estado de latência em neurônios (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013)

Devido às características inflamatórias inerentes destes vetores, foi projetado o HSV-1 recombinante (rHSV-1), tornando estes vetores mais seguros, pois

expressam poucos genes virais do tipo selvagem, mostram baixa toxicidade e têm alta expressão do transgene (GRAY; WOODARD; SAMULSKI, 2010).

Figura10: Representação de vetores virais utilizados em protocolos de terapia gênica



Fonte: (MENCK; VENTURA, 2007).

4.8.2 Vetores não virais

Os vetores não virais incluem os métodos físicos como eletroporação, magnetofecção, entre outras e os métodos químicos envolvem complexos de DNA com polímeros ou lipídios capazes de transferir genes de forma eficiente para as células (KAMIMURA et al., 2011).

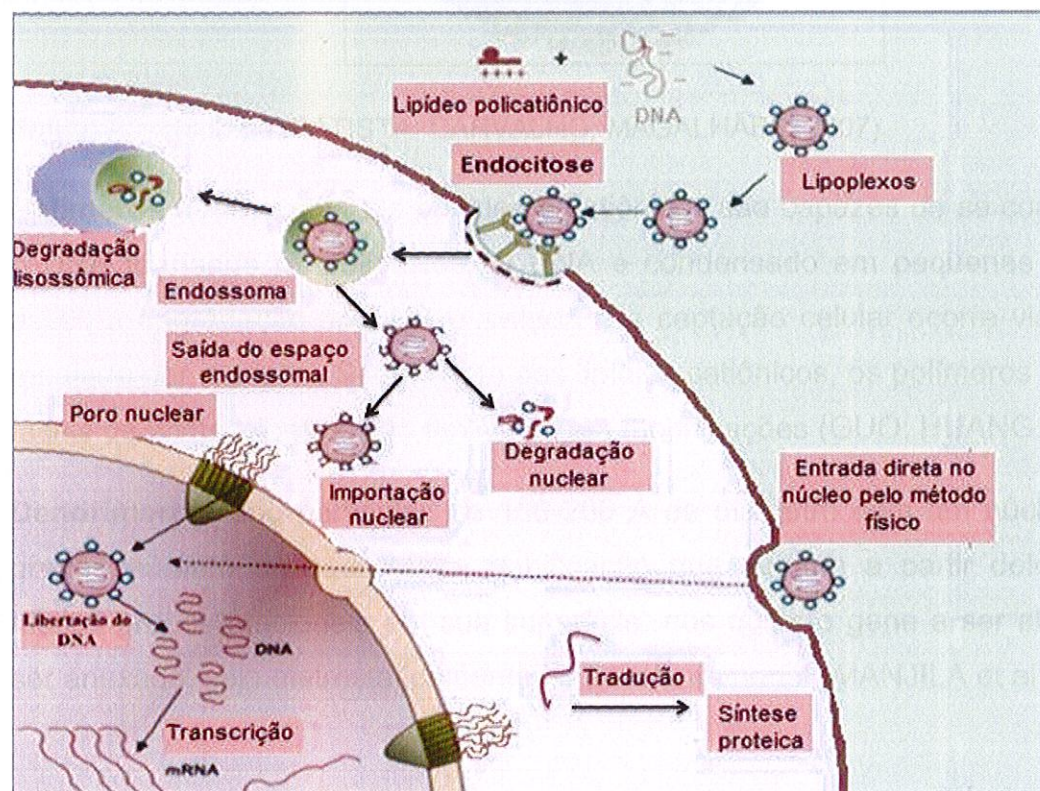
Apesar de ter uma eficiência de transdução gênica *in vivo* baixa, quando comparado com os métodos virais, os vetores não virais possuem muitas vantagens como menor indução do sistema imunológico e nenhuma limitação no tamanho do DNA que os tornaram mais eficazes na entrega do gene terapêutico (NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012).

Lipossomas: São partículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas envolvendo um compartimento aquoso e são formadas espontaneamente quando uma película de lipídios é hidratada em uma solução aquosa. Diversos tipos de lipossomas foram desenvolvidos desde a sua criação. Entretanto, os lipossomas catiônicos são os mais eficazes na entrega de ácidos nucleicos. Esses lipídios são compostos por grupos de cabeça mono ou multi-catiônicos e uma âncora hidrofóbica (fração de colesterol) unida por um linker (SIMÕES et al., 2005).

As cargas negativas do DNA interagem espontaneamente com as cargas positivas do lipossoma e deste modo, DNA e lipossoma se complexam formando os lipoplexos. Para que os lipoplexos se formem de maneira adequada é preciso que a concentração e a proporção entre lipídios e DNA sejam utilizadas em concentrações adequadas para garantir a eficiência da entrega (KAMIMURA et al., 2011).

A entrega do gene terapêutico através do DNA complexados com os lipossomas catiônicos consiste na endocitose mediada por receptor do lipoplexo. Após a internalização, grandes quantidades de complexos são degradadas dentro do endolisossomo e apenas uma pequena fração entra de fato no núcleo, onde é capaz de expressar o gene terapêutico (Figura 11) (KAMIMURA et al., 2011).

Figura 11: Distribuição gênica usando lipoplexos.

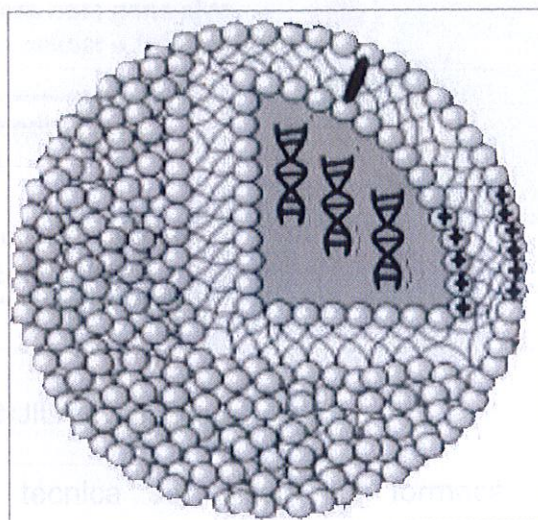


Fonte: adaptado de (PANKAJAKSHAN; AGRAWAL, 2013).

Os lipossomas apresentam inúmeras vantagens na entrega de genes às células como: baixo custo na produção, nenhuma ativação do sistema imunológico, liberação dirigida de compostos bioativos para o local de ação, oferecem um grau de

proteção ao DNA contra degradação mediada por nucleases e são capazes de transportar moléculas grandes de DNA (KAMIMURA et al., 2011).

Figura 12: Ilustração de lipossoma catiônico complexado com DNA.

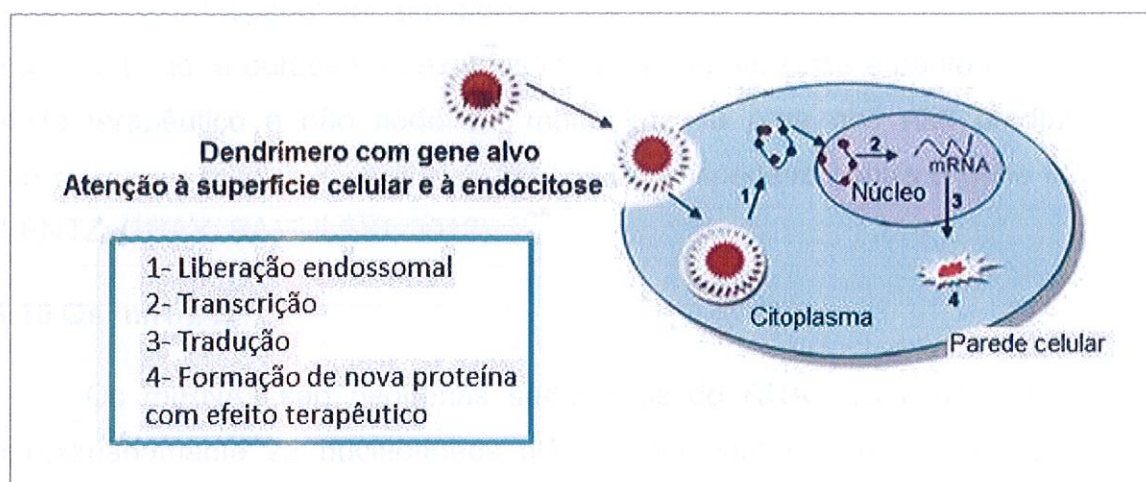


Fonte: Adaptado de (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Polímeros catiônicos: Os polímeros catiônicos são capazes de se complexar com o DNA formando os poliplexos. O DNA é condensado em pequenas partículas e assim a degradação do DNA é evitada e a captação celular ocorre via endocitose mediada por receptor. Semelhante aos lipídios catiônicos, os polímeros também são fáceis de confeccionar e são flexíveis para modificações (GUO; HUANG, 2012).

Dendrimeros: são partículas de 100-200 Å de diâmetro com um núcleo central e grande número de cadeias de ramificação que surgem a partir deles. Eles têm muitos grupos funcionais em sua superfície, nos quais o gene a ser alvejado pode ser anexado, seja eletrostaticamente ou covalentemente (MANJILA et al., 2013).

Figura 13: Entrega do gene baseado em dendrímeros



Fonte: adaptado de (MANJILA et al., 2013).

Eletroporação: essa técnica se baseia na formação de poros através da desestabilização temporária da membrana da célula alvo permitindo a passagem de moléculas de DNA exógeno no citoplasma e no nucleoplasma da célula, mas infelizmente com a técnica de eletroporação o transgene é capaz de se integrar em apenas 0,01% das células tratadas (MANJILA et al., 2013).

Magnetofecção: é um método de transfecção simples e eficiente no qual campos magnéticos são usados para concentrar partículas contendo ácido nucléico nas células alvo. Desta forma, a força magnética permite uma concentração rápida de DNA exógeno, de modo que 100% das células entrem em contato com transgene. A magnetofecção foi adaptada a todos os tipos de ácidos nucleicos (DNA, siRNA, miRNAs, dsRNA, mRNA, etc) (NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012).

4.9 Introdução à terapia gênica no SNC

Os distúrbios relacionados ao SNC estão entre as patologias mais difíceis de tratar devido ao acesso limitado ao tecido cerebral, o qual é protegido pela barreira hematoencefálica, principal obstáculo na realização da terapia gênica em SNC, pois impede que moléculas grandes ou hidrofóbicas passem passivamente para o cérebro (HOCQUEMILLER et al., 2016; GRAY et al., 2011).

Doenças neurológicas, decorrentes de alterações genéticas, muitas vezes resultam na perda ou mau funcionamento de um tecido específico dentro do SNC,

sendo assim o protocolo da terapia gênica deve determinar o vetor ideal que expresse o transgene por um período de tempo que tenha impacto terapêutico máximo. Logo, a duração da expressão não pode ser curta a ponto de não exercer efeito terapêutico e não pode ser muito intensa para que não produza efeitos citotóxicos ou provoque respostas imunes do hospedeiro contra o gene terapêutico (LENTZ; GRAY; SAMULSKI, 2012).

4.10 Os miRNAs

Os miRNAs são pequenas sequências de RNA não codificante (ncRNA), aproximadamente 22 nucleotídeos que se originam de precursores de RNA de cadeia dupla. Essas moléculas são sequências de RNA incapazes de serem traduzidas em proteínas e, portanto, são conhecidos como moléculas regulatórias da expressão gênica pela repressão da tradução ou degradação de mRNAs alvos (KIM, 2005; GOMES; NOLASCO; SOARES, 2013).

Os miRNAs estão diretamente envolvidos na regulação de expressão gênica através do pareamento de bases entre a extremidade 5' do miRNA e a extremidade 3'UTR do mRNA alvo, resultando na repressão ou degradação da sequência de mRNA alvo, no caso da DA seria a sequência de mRNA que será posteriormente traduzido na BACE1 (LIU; FORTIN; MOURELATOS, 2008).

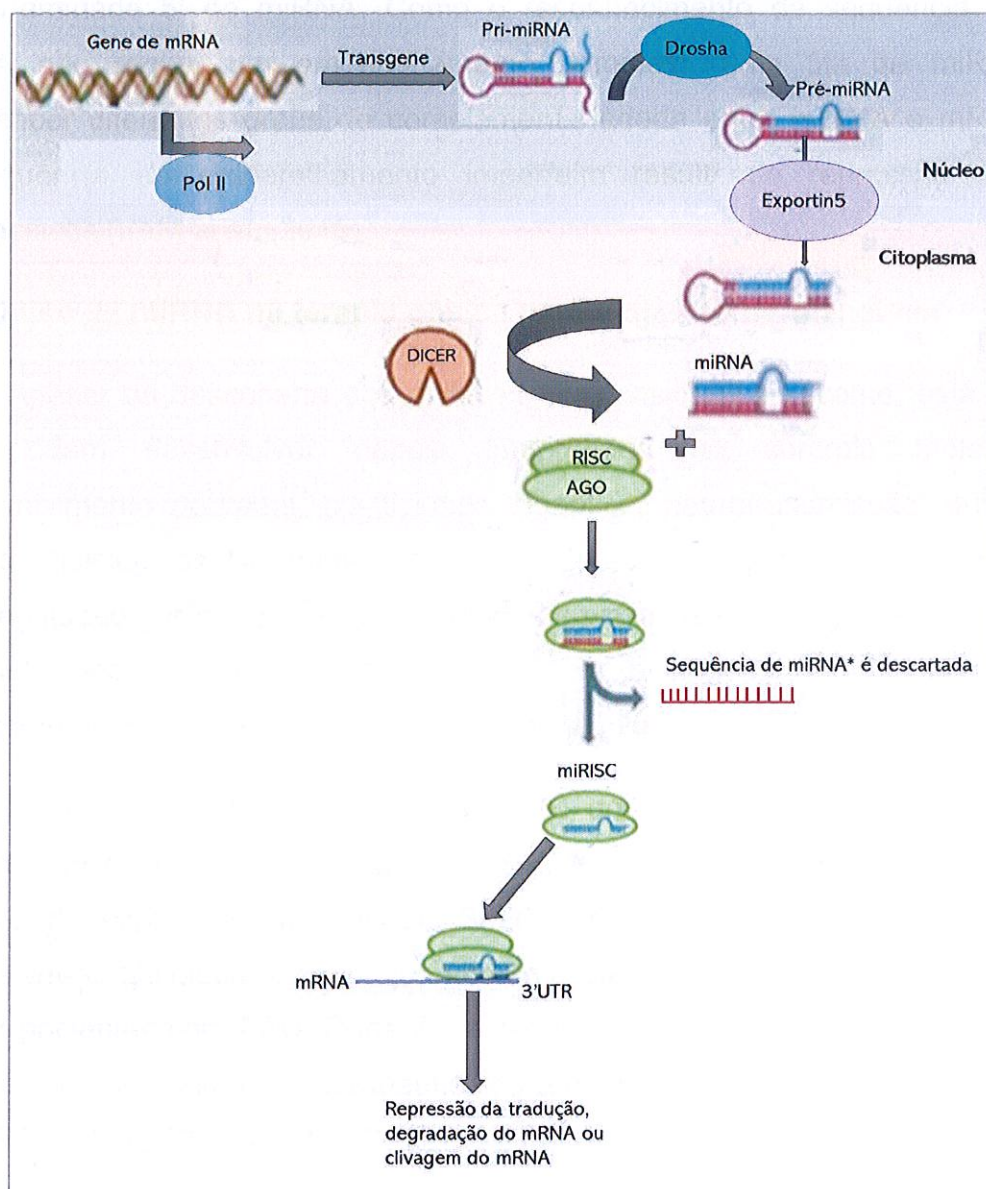
4.10.1 Biogênese de miRNAs

A maioria dos genes de miRNAs são transcritos pela polimerase II. Geralmente, os genes de miRNA tendem a estarem próximos uns dos outros e são transcritos como policistrônicos, ou seja, são capazes de produzir mais de um miRNA (LIU; FORTIN; MOURELATOS, 2008).

Os miRNAs são derivados de RNAs dupla fita maiores que se dobram sobre si mesmos para formar uma estrutura em grampo característico. Esses miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II no núcleo, originando o miRNA primário ou pri-miRNA, o qual apresenta as extremidades 5' e 3' poliadenilado com estrutura de haste de cadeia dupla. A pri-miRNA é clivada pelo complexo formado pela Drosha mais a subunidade DCGR8 formando o pré-miRNA com cerca de 70-100 nucleotídeos com desemparelhamentos intercalados e com 2 nucleotídeos

suspensos na extremidade 3'. O pré-miRNA é então transportado para o citoplasma, pela exportin 5, onde será processada pela Dicer, uma ribonuclease III, formando um duplex de miRNA com aproximadamente 25 nucleotídeos. Este duplex irá se associar à RISC formando o complexo miRISC. O duplex de miRNA é desenrolado, descartando a cadeia complementar, designada de miRNA*, que será degradada pela agonaute 2 (Ago2). O miRNA maduro de fita simples guia o complexo miRISC associado à proteína Ago até a sequência de mRNA alvo. Assim, o miRNA é capaz de se ligar aos mRNAs alvo por meio do pareamento parcial de bases e, conseqüentemente, ocorre o silenciamento do gene alvo pela repressão da tradução, degradação ou clivagem de mRNA. A Figura 14 ilustra o processo de formação e silenciamento de genes com miRNAs (LAM et al., 2015; LIU; FORTIN; MOURELATOS, 2008; BARTEL, 2009).

Figura 14: Mecanismos de silenciamento de genes de miRNA.



Nota: A transcrição do gene miRNA é realizada pela RNA polimerase II no núcleo para formar pri-miRNA, que é então clivado por Drosha para formar pré-miRNA. O pré-miRNA é transportado pela Exportina 5 para o citoplasma, onde é processado pela Dicer em miRNA. O miRNA é carregado no RISC, onde o miRNA* é descartado, e o miRISC é guiado para sequência de RNAm alvo através de ligação parcialmente complementar. A tradução do RNAm alvo é inibido por meio da repressão, degradação ou clivagem do RNAm alvo.

Fonte: Adaptado de (LAM et al., 2015).

A identificação do mRNA alvo ocorre baseado na complementariedade das sequências nucleotídicas entre o miRNA e o mRNA alvo. O emparelhamento do miRNA com seu mRNA alvo ocorre na região não traduzida 3' UTR e na região

anterior chamada de “sequência de sementes” que é composta de 2-8 nucleotídeos na extremidade 5’ do miRNA. Como o reconhecimento da sequência alvo pelo miRNA não requer um emparelhamento completo, uma fita de miRNA pode reconhecer diferentes graus de complementariedade entre miRNA e mRNA como consequência do emparelhamento imperfeito resultando repressão de genes inespecíficos (LAM et al., 2015).

4.11 O uso de miRNA na terapia gênica para a doença de Alzheimer

Apesar da descoberta dos miRNAs ser considerada recente, está claro que eles podem desenvolver papéis importantes no controle molecular do desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, neurotransmissão, entre outros aspectos fisiológicos. Um número crescente de estudos sobre a utilização de mir-29 para regulação gênica de vias desreguladas envolvidas na patogênese de Alzheimer tem sido desenvolvido, apontando que esta biomolécula pode ter um papel importante na regulação da DA (PEREIRA et al., 2016; HEBERT et al., 2008).

Estudos demonstraram que os níveis do mir-29a/b1 estão diminuídos em cérebros de pacientes com DA e que esta família de miRNA é responsável pelo controle da expressão de BACE1. Sendo assim, os níveis desta β - secretase encontram-se elevados e, conseqüentemente, há o aumento dos níveis do peptídeo A β em pacientes com FAD. Portanto, a regulação da expressão de BACE1 via mir-29 é considerado como alvo terapêutico para a diminuição da produção de A β na DA (PEREIRA et al., 2016; HEBERT et al., 2008).

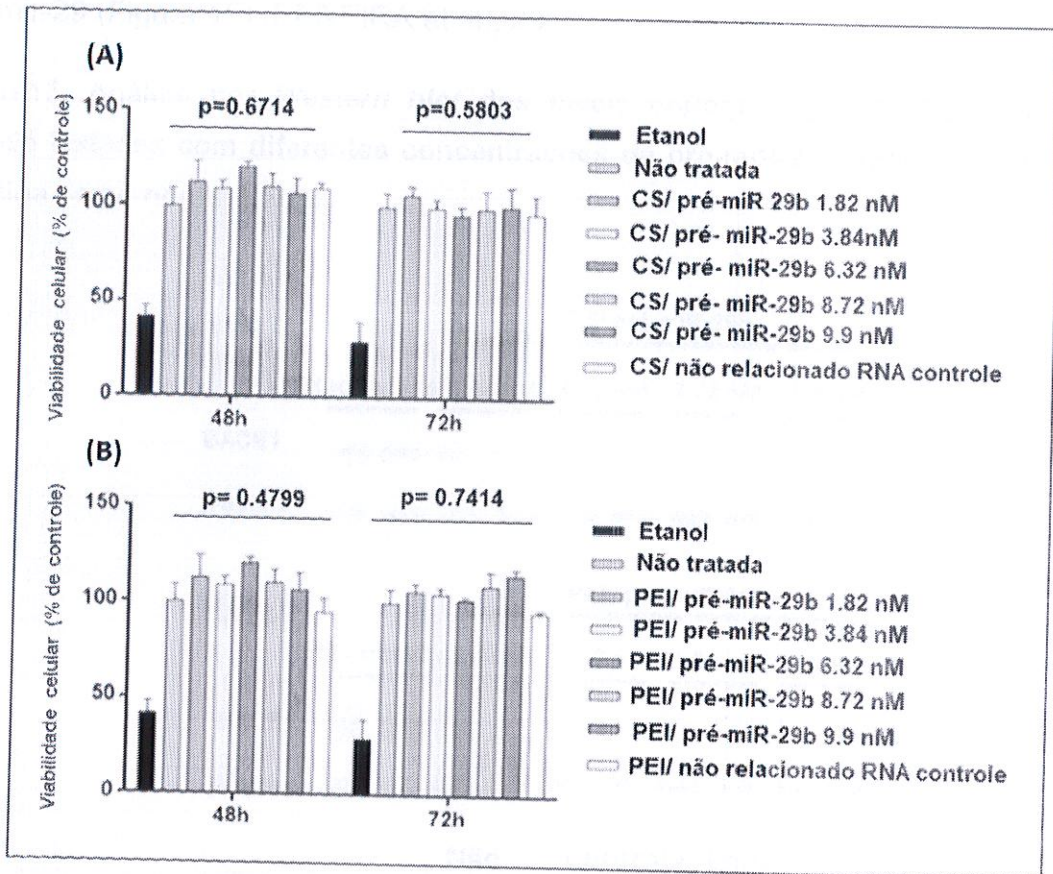
A síntese de miRNAs, para fins terapêuticos, pode ocorrer por meio de métodos químicos, síntese enzimática ou ainda, expressão via plasmídeo. Embora esses três métodos pareçam eficazes para a produção de miRNAs, os protocolos de síntese dessas biomoléculas exigem processos de purificação adicionais para remover impurezas e, assim, evitar o silenciamento gênico não direcionado associado a diminuição da eficácia terapêutica. Entretanto, estes processos de purificação apresentam um custo muito elevado, além de ocorrer a degradação de RNA devido ao uso de solventes tóxicos (PEREIRA et al., 2016).

Para minimizar os custos e a degradação de RNA, Pereira e colaboradores (2016) propuseram um novo processo de produção de mir-29 recombinante e

purificação por cromatografia de afinidade com arginina, que poderia contribuir para o estabelecimento de protocolos terapêuticos com melhor custo benefício. No entanto, para melhorar a atividade biológica baseado em miRNA é essencial o uso de vetores eficientes. De modo a suprir as características ideais para um vetor de entrega, polímeros catiônicos como Polietilenimina (PEI) e Quitosana (CS) foram desenvolvidos para a entrega dos miRNAs para paciente com DA. Esses vetores apresentam diâmetro de aproximadamente 200 nm e alta estabilidade (PEREIRA et al., 2016).

O Gráfico 6 mostra que as células permaneceram viáveis após a transfecção dos vetores, sugerindo que estes métodos de entrega são adequados para o uso na terapia gênica. No estudo em questão as células não tratadas e células transfectadas com controle de RNA não especificados foram utilizados como controle negativo para citotoxicidade, enquanto células tratadas com etanol foram usadas como controle positivo para citotoxicidade (PEREIRA et al., 2016).

Gráfico 6: Ensaios realizados para verificar a viabilidade celular cultivadas em concentrações crescentes de CS/ pré-miR-29b (A) e PEI/ pré-miR-29b (B), por 48 e 72 horas.



Nota: Células não tratadas e células transfectadas com um controle de RNA não relacionado foram utilizadas como controles negativos para citotoxicidade. Células tratadas com etanol foram usadas como controle positivo para induzir toxicidade.

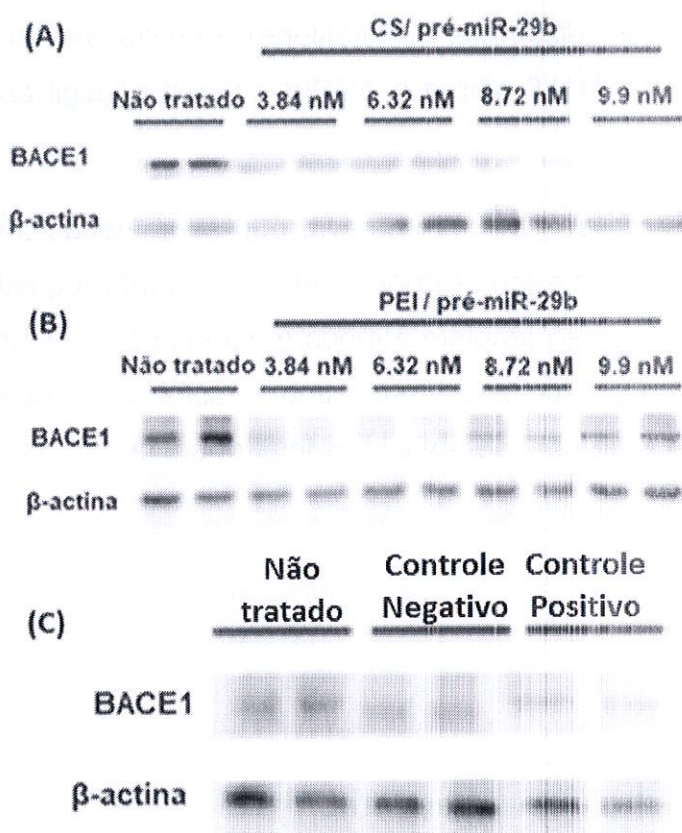
Fonte: Adaptado de (PEREIRA et al., 2016).

As pesquisas realizadas por Pereira e colaboradores utilizaram células modelo para DA expressando o gene da APP695 humano (células N2a695), estas células são ideais para o estudo, pois apresentam expressão de BACE1 endógena constitutiva permitindo maior sensibilidade nas análises. Foi realizada a administração de pré-mir29b, inserido nos vetores PEI e CS, em diversas concentrações e o efeito terapêutico foi analisado por Western blot (PEREIRA et al., 2016).

Os resultados revelaram que em células tratadas com CS/pré-mir-29b houve diminuição dos níveis endógenos de BACE1, em cerca de 78%, enquanto que em

células tratadas com PEI/ pré-miR29 a diminuição foi de aproximadamente 86% em relação às células não tratadas. Além destes resultados, o Western blot revelou diminuição de BACE1 em até 82% dependente da concentração de vetores com o pré-mir-29 (Figura 15) (PEREIRA et al., 2016).

Figura15: Análise por *Western blot* dos níveis endógenos de BACE1 em células N2a695 tratadas com diferentes concentrações de pré-miR-29b após 72 h, utilizando β -actina como normalizador.



Nota: A – B Imagens representativas de Western blot a partir de células N2a695 após 72 horas de transfecção com CS / pre-miR-29b, PEI / pre-miR-29b respectivamente.

C- Comparação de células não tratadas com controle negativo e controle positivo de mir-29b.

Fonte: Adaptado de (PEREIRA et al., 2016).

Os resultados obtidos por Pereira e colaboradores (2016) demonstram que a superexpressão do pré-mir29b induz uma diminuição considerável de BACE1 e, conseqüentemente, da produção de A β 42 (PEREIRA et al., 2016).

Além disso, foi possível notar que uma única aplicação de CS / pré-mir-29b diminuiu os níveis de BACE1 com a supressão da expressão em até $78,5 \pm 4,5$, de modo que, a aplicação do gene terapêutico utilizando a PEI/pré-mir-29b houve a supressão de até $86,1 \pm 1,2\%$ e a geração de A β 42diminui em $44,2 \pm 6,0\%$ e $47,2 \pm 11,4\%$, respectivamente (PEREIRA et al., 2016).

Além do miRNA estudado por Pereira et al. Outros miRNAs também estão sendo estudados como potenciais alvos terapêuticos para doença de Alzheimer, uma vez que muitos miRNAs, como miR-106a / 106b, miR-20a, miR-17-5p, entre outros, participam do processo de regulação da expressão de APP e regulação da BACE1 por meio da ligação desses miRNA á região 3'UTR (WANG; QIN; TANG, 2019).

Sendo assim, observamos que diversas estratégias de terapia gênica estão sendo desenvolvidas para tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer, mas ainda são necessários mais estudos e coortes maiores para uma investigação mais precisa dos resultados e da eficácia dos tratamentos para que essa doença possa ter um maior controle, oferecendo maior qualidade de vida para os pacientes e seus familiares.

CONCLUSÃO

Este trabalho abordou conceitos sobre a terapia gênica com intuito de demonstrar hipóteses que culminem com um tratamento eficaz para pacientes que sofrem com a doença de Alzheimer, e assim melhorar a qualidade de vida destes indivíduos e de seus familiares.

Durante a pesquisa por meio de artigos científicos, observou-se que os microRNAs nestes pacientes encontram-se alterados e esta alteração têm relação com variação na expressão de genes importantes na patogênese da DA. Logo, a terapia gênica para o Alzheimer tem como objetivo regular a expressão da *BACE1*, que em paciente com a doença encontra-se elevado, pelo miR-29 e com isso há a diminuição da produção do peptídeo neurotóxico A β . Entretanto, para que estes procedimentos sejam viáveis, é necessário que haja mais pesquisas para o desenvolvimento de vetores capazes de apresentar alta eficiência de transdução, baixa imunogenicidade e alta especificidade.

Com esta análise, chegou-se a conclusão que a terapia gênica, capaz de entregar genes ao Sistema Nervoso Central, mostrou-se como uma alternativa aos tratamentos farmacológicos, que atualmente são utilizados de maneira paliativa aos sintomas da doença. Sendo assim, as vantagens do tratamento com a terapia gênica pode proporcionar maior durabilidade do efeito terapêutico e conseqüentemente, em longo prazo, se tornar uma terapêutica mais econômica comparada ao método medicamentoso.

Conclui-se que, para que a terapia gênica se torne cada vez mais acessível, é necessário que haja mais investimentos em pesquisas que buscam um tratamento eficaz para a DA, permitindo que as pesquisas desenvolvidas até o momento possam prosseguir para uma nova fase, extrapolando os experimentos para pacientes da doença.

REFERÊNCIAS

AASETH, Jan et al. Treatment strategies in Alzheimer's disease: a review with focus on selenium supplementation. **Biometals**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.827-839, 16 ago. 2016.

Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5034004/#__ffn_sectitle. Acesso em: 15 mar. 2019.

ALVES, Luísa et al. Alzheimer's Disease: A Clinical Practice-Oriented Review. **Frontiers In Neurology**, [s.l.], v. 3, p.1-20, 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3330267/pdf/fneur-03-00063.pdf>.

Acesso em: 02 jan. 2019.

ARBOR, Sage C.; LAFONTAINE, Mike; CUMBAY, Medhane. Amyloid-beta Alzheimer targets: protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. **Yale Journal of Biology and Medicine**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.5-21, Não é um mês valido!

2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797837/>.

Acesso em: 15 mar. 2019.

BARTEL, David P.. MicroRNAs Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, [s.l.], v. 136, n. 2, p.215-233, jan. 2009. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794896/pdf/nihms513712.pdf>.

Acesso em: 10 out. 2019.

BASAVARAJU, Manasa; LENCASTRE, Alexandre de. Alzheimer's disease: presence and role of microRNAs. **Biomol Concepts**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.241-252, ago. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>.

Acesso em: 15 jan. 2019.

BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros de; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p.167-179, jun. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-3322007000200003>. Acesso em: 20 dez. 2018.

BERMUDEZ, Jesus Ramirez. Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept. **Archives Of Medical Research**, Mexico, v. 43, n. 8, p.595-599, nov. 2012. Disponível em: <[https://www.arcmedres.com/article/S0188-4409\(12\)00336-0/fulltext](https://www.arcmedres.com/article/S0188-4409(12)00336-0/fulltext)>. Acesso em: 20 abr. 2018.

CACABELOS, Ramón; TORRELLAS, Clara. Epigenetic drug discovery for Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s.i.], v. 9, n. 9, p.1059-1086, jul. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989365>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

CARRILLO-MORA, Paul; LUNA, Rogelio; COLÍN-BARENQUE, Laura. Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects?. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.i.], v. 2014, n. 1, p.1-15, fev. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941171/#!po=13.0631>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

DE-PAULA, Vanessa J. et al. Alzheimer's disease. **Subcellular Biochemistry**, [si], v. 65, n. 5, p.329-352, dez. 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-007-5416-4_14>. Acesso em: 23 dez. 2018.

FALCO, Anna de et al. Alzheimer's Disease: Etiological Hypotheses and Treatment Perspectives. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 1, p.63-80, jan. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000100063>. Acesso em: 01 set. 2018.

FÉCCHIO, Dânia Caroline; MACEDO, Luciana Conci; RICC, Gléia C. Laverde. Use of Gene Therapy in the Treatment of Diseases. **Revista Uningá Review**, [s.i.], v. 21, n. 1, p.44-49, mar. 2015. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1614/1225>>. Acesso em: 15 out. 2018.

GINN, Samantha L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. **The Journal Of Gene Medicine**, [s.i.], v. 20, n. 5, p.3015-3020, 19 abr. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.3015>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

GOMES, Anita; NOLASCO, Sofia; SOARES, Helena. Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.16010-16039, 31 jul. 2013.. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759897/#__ffn_sectitle>. Acesso em: 09 mar. 2019.

GRAY, Steven J et al. Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates. **Molecular Therapy**, [s.i.], v. 19, n. 6, p.1058-1069, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3129805/>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

GRAY, Steven J; WOODARD, Kenton T; SAMULSKI, R Jude. Viral vectors and delivery strategies for CNS gene therapy. **Hhs Public Access**, [s.i], v. 1, n. 4, p.517-534, out. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509525/>>. Acesso em: 05 out. 2018.

GUO, Xia; HUANG, Leaf. Recent Advances in Non-viral Vectors for Gene Delivery. **Accounts Of Chemical Research**, [s.i], v. 7, n. 45, p.971-979, jul. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3240701/>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GUTIERREZ, Beatriz Aparecida Ozello et al. Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos?. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.4479-4486, nov. 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.org/pdf/csc/2014.v19n11/4479-4486/pt>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

HEBERT, Sebastien S. et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ β -secretase expression. **Pnas**, [s.i], v. 105, n. 17, p.6415-6420, abr. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2359789/#__ffn_sectitle>. Acesso em: 09 mar. 2019.

HOCQUEMILLER, Michaël et al. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. **Human Gene Therapy**, [s.i], v. 27, n. 7, p.478-496, jul. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960479/>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

IWAMI, Ken-ichiro; NATSUME, Atsushi; WAKABAYASHI, Toshihko. Gene therapy for high-grade glioma. **Neurologia Medico-chirurgica**, Tokio, v. 9, n. 50, p.727-736, nov. 2011. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/3996/c5513e10493f9fee664b38a02a101a77c3db.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

JÚNIOR, Arilton Januário Bacelar et al. Genetic Engineering as New Methodology HIV Fighting: A Gene Therapy, the RNA Interference in and it's Applications. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, [s.i], v. 13, n. 5, p.50-55, fev. 2016. Disponível em: <https://www.mastereditora.com.br/periodico/20160131_111757.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2019.

KALBURGI, Sahana Nagabhushan; KHAN, Nadia N.; GRAY, Steven J.. Recent Gene Therapy Advancements for Neurological Diseases. **Discovery Medicine**, [si], v. 15, n. 81, p.111-119, fev. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554939/>>. Acesso em: 15 out. 2018.

KAMIMURA, Kenya et al. Advances in Gene Delivery Systems. **Pharmaceutical Medicine**, [s.i], v. 5, n. 25, p.293-306, out. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245684/>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

KIM, V. Narry. Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function. **Molecules And Cells**, [s.i], v. 19, n. 1, p.1-15, fev. 2005. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/f8d0/c39eb277166836edaacdbf0bb3db2528dcd6.pdf>>. Acesso em: 9 mar. 2019.

LAM, Jenny K W et al. SiRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.i.], v. 4, n. 9, p.2-20, 2015.

Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877448/pdf/mtna201523a.pdf>>.

Acesso em: 10 mar. 2019.

LENTZ, Thomas B.; GRAY, Steven J.; SAMULSKI, R. Jude. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. **Neurobiology of Disease**, [s.i.], v. 48, n. 2, p.179-188, nov. 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3293995/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p.31-69, 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-0142010000300004>.

Acesso em: 15 out. 2019.

LIU, Xuhang; FORTIN, Kristine; MOURELATOS, Zissimos. MicroRNAs: Biogenesis and Molecular Functions. **Brain Pathology**, [s.i.], v. 18, n. 1, p.113-121, jan. 2008.

Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x)

[3639.2007.00121.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x)>. Acesso em: 09 mar. 2019.

MANJILA, Steffy B et al. Novel gene delivery systems. **International Journal Of Pharmaceutical Investigation**, [s.i.], v. 3, n. 1, p.1-7, mar. 2013. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3687232/>>. Acesso em: 10 dez.

2018.

MASTERS, Colin L. et al. Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], p.01-18, 15 out. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrdp201556.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2018.

MCKHANN, Guy M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.263-269, mai. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312024/pdf/nihms363310.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2018.

MENCK, Carlos Frederico Martins; VENTURA, Armando Moraes. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista Usp**, São Paulo, v. 1, n. 75, p.50-61, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13620/15438>>. Acesso em: 16 set. 2018

MOSCONI, L.; MCHUGH, P. F.. FDG- and amyloid-PET in Alzheimer's disease: the whole greater than the sum of the parts?. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.250-264, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290913/pdf/nihms358677.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2018.

NARDI, Nance Beyer; TEIXEIRA, Leonardo Augusto Karam; SILVA, Eduardo Filipe Ávila da. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, p.109-116, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232002000100010>. Acesso em: 25 ago. 2018.

NAYEROSSADAT, Nouri; ALI, Palizbanabas; MAEDEH, Talebi. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. **Advanced Biomedical Research**, [s.i.], v. 27, n. 1, p.27-38, jul. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507026/?report=printable>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

NILSSON, Per et al. Gene therapy in Alzheimer's disease: potential for disease modification. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s.i.], v. 14, n. 4, p.741-757, fev. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823109/>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

OHNO, Masuo et al. BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Neuron**, [s.i.], v. 41, n. 3, p.27-33, jan. 2004. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0896-6273%2803%2900810-9>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

OHNO, Masuo et al. Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. **European Journal Of Neuroscience**, [s.i.], v. 23, n. 1, p.251-260, jan. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1460-9568.2005.04551.x>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

OLIVEIRA FILHO, José de A.; MARTINS, José Rodrigo N. Biologia Molecular da Doença de Alzheimer. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p.24-30, 23 nov. 2018. Disponível em: <<file:///C:/Users/q/Downloads/Biologia%20Molecular%20da%20Doen%C3%A7a%20de%20Alzheimer.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ORGANIZATION, World Health. **Dementia**. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 25 ago. 2018.

PANKAJAKSHAN, Divya; AGRAWAL, Devendra K.. Clinical and translational challenges in gene therapy of cardiovascular diseases. In: MOLINA, Fm. **Gene Therapy: Tools and Potential Applications**. [s.i]: Rijeka, 2013. p. 651-683. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/clinical-and-translational-challenges-in-gene-therapy-of-cardiovascular-diseases>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

PEREIRA, Patrícia A. et al. Recombinant pre-miR-29b for Alzheimer's disease therapeutics. **Scientific Reports**, [s.i], v. 19, n. 6, p.1-11, jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730146/#!po=76.1364>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

PEREIRA, Patrícia Alexandra Nunes (a). **MiRNA-29 bioseparation and target delivery strategies for Alzheimer's disease**. 2016. 3 v. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Ciências, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2016. Cap. 1.

SELKOE, Dennis J.. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. **Physiological Reviews**, Boston, v. 81, n. 2, p.741-766, abr. 2001. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.2001.81.2.741>>. Acesso em: 09 ago. 2018.

SERRANO-POZO, Alberto et al. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives Medicine**, [s.i], v. 1, n. 1, p.1-23, set. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3234452/>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

SIMÕES, Sérgio et al. Cationic liposomes for gene delivery. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [s.i.], v. 2, n. 2, p.237-254, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.2.2.237>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

TORRES, Karen Cecília de Lima et al. Biomarkers in Alzheimer disease. **Geriatrics, Gerontology And Aging**, [s.i.], v. 6, n. 3, p.273-282, 2012. Disponível em: <<http://ggaging.com/details/191/pt-BR/biomarkers-in-alzheimer-disease>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

VASSAR, Robert. BACE1 inhibition as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. **Journal of Sport and Health Science**, [s.i.], v. 5, n. 4, p.388-390, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jshs.2016.10.004>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188930/>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

VEERAPPAN, Chendhore S.; SLEIMAN, Sama; COPPOLA, Giovanni. Epigenetics of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. **Neurotherapeutics**, [s.i.], v. 10, n. 4, p.709-721, 25 set. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3805876/>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

WANG, Mengli; QIN, Lixia; TANG, Beisha. MicroRNAs in Alzheimer's disease. **Frontiers In Genetics**, [s.i.], v. 10, n. 153, p.1-13, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6405631/pdf/fgene-10-00153.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

WILEY, Jesse C et al. Familial Alzheimer's disease mutations inhibit gamma-secretase-mediated liberation of beta-amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment. **Journal Neurochemistry**, [s.i], v. 5, n. 94, p.1189-1201, set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15992373>>. Acesso em: 25 dez. 2018.

YAN, Riqiang; VASSAR, Robert. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. **Lancet Neurol**, [s.i], v. 13, n. 3, p.319-329, mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4086426/pdf/nihms593450.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

ZHANG, Yun-wu et al. APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, [s.i], v. 4, n. 3, p.1-13, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022812/>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

ZHOU, Zhi-dong et al. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease (AD). **Cell Adhesion & Migration**, [s.i], v. 5, n. 4, p.280-292, ago. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3210295/pdf/cam0504_0280.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2019.