

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Thainá de Jesus Souza

**EDITORES GENÔMICOS E SUAS APLICAÇÕES NA DOENÇA DE
HUNTINGTON**

São Paulo

2019

Thainá de Jesus Souza

**EDITORES GENÔMICOS E SUAS APLICAÇÕES NA DOENÇA DE
HUNTINGTON**

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

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Souza, Thainá de Jesus

Editores genômicos e suas aplicações na doença Huntington / Thainá de Jesus Souza. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.
53 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima.

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

1. Doença de Huntington 2. Nucleases de dedos de zinco 3. Nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição 4. Reparo do DNA 5. Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas I. Lima, Fabio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.8

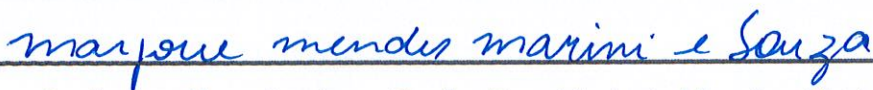
Thainá de Jesus Souza

**EDITORES GENÔMICOS E SUAS APLICAÇÕES NA DOENÇA DE
HUNTINGTON**

São Paulo, 2019



Professor orientador – Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima



Professor Examinador – Profa. Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe, pelo apoio e paciência durante esses anos da graduação. Pelos abraços, pelas palavras de incentivo para seguir frente e em enfrentar as adversidades nos momentos que pensei em desistir.

Aos meus irmãos pelo carinho, pela compreensão nos momentos de festas de família que não pude comparecer por precisar estudar. E, principalmente, minha irmã Elisangela, minha inspiração de mulher independente. Graças a você, vi que era possível conciliar estudos, trabalho, não ser vencida pelo cansaço e nunca desistir do meu sonho.

Aos meus amigos e colegas que acompanharam essa jornada. Obrigada pelas risadas, pela ajuda, pelo incentivo. Cada um sabe a importância que teve em minha vida durante esta etapa. Já deu certo, gratidão.

E ao professor Fabio, responsável por fazer com que eu tenha escolhido seguir essa área incrível que é a Biologia Molecular. Obrigada pela orientação para redigir este trabalho, pela enorme paciência e disponibilidade.

SOUZA, Thainá de Jesus. **Editores genômicos e suas aplicações na doença de Huntington**. 2019. 53f. (Bacharel no curso de Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

A Doença de Huntington é uma doença com padrão de herança autossômica dominante, causada por uma amplificação gênica, devido a expansão trinucleotídica de bases CAG no éxon 1 do gene HTT. Esta alteração leva a perda prevalente de neurônios espinhosos eferentes médios (MSNs) no estriado (núcleo caudado e putâmen), dos gânglios da base, córtex e hipocampo. Como esta doença não tem cura, são utilizados fármacos para a diminuição dos sintomas, entretanto, acabam gerando eventos adversos indesejáveis. Devido a isso, a busca pelo silenciamento do gene mutante tem sido feita como potencial caminho terapêutico. A utilização de nucleases em locais específicos para fins terapêuticos retrata uma transformação no paradigma na terapia genética e a utilização dos editores de genoma como ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9 possibilitam modificações genéticas eficientes por meio da quebra de dupla fita de DNA e mecanismos de reparo do DNA celular. Proposto por diversos estudos e revisado neste trabalho, tais editores alcançaram a redução da expressão de HTT mutante *in vitro* e *in vivo*, sendo que, especificamente as ferramentas ZFN e CRISPR/Cas9 sugeriram que é possível a atenuação eficiente e permanente da toxicidade neuronal mediada pela expansão do polyQ no cérebro adulto de camundongos, aliviando seus déficits motores e sintomas neurológicos.

Palavras-chave: 1. Doença de Huntington 2. Nucleases de dedos de zinco 3. Nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição 4. Reparo do DNA 5. Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas

SOUZA, Thaina de Jesus. **Genomic editors and their applications in Huntington's disease**. 2019. 53f. (Bachelor in Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

Huntington's disease is a disease with autosomal dominant inheritance pattern caused by a gene amplification due to the trinucleotide expansion of CAG bases in exon 1 of the HTT gene. This change leads to the prevalent loss of medial efferent spindle neurons (MSNs) in the striatum (caudate nucleus and putamen), the basal ganglia, cortex and hippocampus. As this disease has no cure, drugs are used to decrease symptoms, however, end up generating undesirable adverse events. Because of this, the quest for silencing the mutant gene has been made as a potential therapeutic pathway. The use of nucleases at specific sites for therapeutic purposes portrays a transformation in the paradigm in gene therapy and the use of genome editors such as ZFN, TALEN and CRISPR / Cas9 enable genetic and efficient modifications by breaking DNA double strand and mechanisms of cellular DNA repair. Proposed by several studies and reviewed in this work, such editors achieved reduction of mutant HTT expression in vitro and in vivo, and specifically the ZFN and CRISPR / Cas9 tools have suggested that efficient and permanent attenuation of neuronal toxicity mediated by expansion of polyQ in the adult brain of mice, relieving their motor deficits and neurological symptoms.

Keywords: 1. Huntington's disease 2. Zinc finger nuclease 3. Transcription activator-like effector nucleases 4. DNA repair 5. Clustered regularly interspaced phort Palindromic repeats

Lista de figuras

Figura 1 - Localização cromossômica do gene HTT	14
Figura 2 – Estruturas cerebrais afetadas na Doença de Huntington.....	14
Figura 3 - Mecanismo celular fisiopatológico na Doença de Huntington	15
Figura 4- Eletroferograma da genotipagem da DH	18
Figura 5 - Análise do tamanho dos amplicons por meio de Sequenciamento Automático de DNA	19
Figura 6 – Estrutura e funcionamento do ZFN	26
Figura 7- Estrutura TALEN	27
Figura 8 – Estrutura CRISPR/Cas9.....	29
Figura 9 – Construção do plasmídeo para expressão do ZFN	30
Figura 10 – Representação dos componentes para expressão do sistema CRISPR-Cas9 empacotado no vetor de transferência do gene AAV	32
Figura 11 – Mecanismos de reparo do DNA	33
Figura 12 – Esquema de ligação no DNA por ZFNs específicos para CAG.....	35
Figura 13 – Clivagem dos trechos de repetição CAG por ZFNs.....	35
Figura 16 – SNP que altera a sequência PAM.....	41
Figura 17 – Resultados do direcionamento de duplo gRNA específicos para o alelo mutante mediado por CRISPR/Cas9	42
Figura 18 - Imagem representando uma estratégia de edição alelo específica para anular expressão do HTT mutante	43

Lista de Siglas

AAV	Vírus adeno-associado
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAG	Citosina, adenina, guanina
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas
DH	Doença de Huntington
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Quebras da dupla fita de DNA
GABA	Ácido gama aminobutírico
gRNA	RNA guia
HDR	Reparo dirigido por homologia
HTT	Huntingtina
ISRS	Inibidores Seletivos da Recapitação de Serotonina
KRAB	Caixa associada a Krüppel
MSNs	Neurônios espinhosos eferentes médios
NHEJ	Junção de extremidades não homologas
NMDAR	Receptor N metil D Aspartato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
polyQ	Poliglutamina
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TALEN	Nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição
ZFN	Nucleases de dedos de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 OBJETIVO	11
3 METODOLOGIA	12
4 DESENVOLVIMENTO	13
4.1 Gene HTT	13
4.2 Fisiopatologia da Doença de Huntington	14
4.3 Manifestações Clínicas	16
4.4 Diagnóstico Molecular	17
4.5 Tratamento Farmacológico	19
4.6 Editores de Genoma	20
4.6.1 Histórico	22
4.6.2 Zinc Finger Nuclease	25
4.6.3 TALEN	26
4.6.4 CRISPR/Cas9	27
4.7 Expressão da nuclease e métodos de entrega para a célula	29
4.8 Mecanismos de reparo do DNA	32
4.9 Edição do alelo HTT mutante	34
4.9.1 Edição utilizando Zinc Finger Nuclease	34
4.9.2 Edição utilizando TALEN	38
4.9.3 Edição utilizando CRISPR/Cas9	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Huntington (DH) foi descrita por George Huntington em 1872 como um relato sobre sintomas psiquiátricos e cognitivos cuja manifestação ocorria na vida adulta, entre 30 e 40 anos, ficando conhecida na época como Coreia Hereditária (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

É uma doença genética com padrão de herança do tipo autossômico dominante. O gene está localizado próximo à extremidade telomérica do braço curto do cromossomo 4, na posição 4p16.3 e codifica a proteína huntingtina (WALTER; GRAVE; PÉRICO, 2009). O distúrbio é causado por uma amplificação gênica, ou seja, está associada a uma expansão trinucleotídica de bases CAG no éxon 1 do gene HTT (XIMENES; TEIXEIRA, 2009).

A prevalência da Doença de Huntington é variável conforme etnia, sendo mais frequente na população com ascendência europeia, com prevalência de 5,70/100.000. Já em países com predomínio de população asiática, a prevalência é menor, de 0,40 por 100 mil. Na África, os dados são inadequados, sendo o transtorno subestimado nesta população e, no Brasil, os poucos estudos sobre a doença, dificultam a obtenção de dados que demonstram a real prevalência (PEREIRA, 2015).

Devido ao amplo quadro de manifestações sintomatológicas compatíveis com outras desordens neurológicas, somente o diagnóstico clínico é limitado e, além do detalhamento do histórico familiar, é fundamental a realização de testes genéticos para confirmação da doença. É feito, portanto, uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que mostra a expansão do trinucleotídeo CAG (XIMENES; TEIXEIRA, 2009).

Os alelos considerados normais possuem menos de 27 repetições CAG, com fenótipo normal. Os alelos intermediários têm de 27 a 35 repetições CAG, são considerados instáveis, e por isso, há risco de transmissão de um alelo expandido para a prole. Apesar disso, os portadores deste tipo de alelo apresentam um fenótipo normal (MIGUEL et al., 2012). A penetração reduzida é vista entre 36 e 39 repetições, enquanto indivíduos com mais de 39 CAG repetidas são os de penetrância completa, e determinam, inevitavelmente, em alguma etapa da vida o fenótipo da Doença de Huntington (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017). Portanto, os indivíduos que apresentam mais de 39 repetições de CAG, irão apresentar movimentos coreicos (espasmódicos, de torção, como se fossem movimentos de dança) e incontroláveis dos membros,

mudança de personalidade e deterioração intelectual (WALTER; GRAVE; PÉRICO, 2009). Por mais que existam muitos estudos experimentais, ainda não existe uma forma de prevenir ou curar a DH. O tratamento consiste em diminuir os sintomas relacionados a distúrbios comportamentais e depressivos utilizando antidepressivos, antipsicóticos para combate aos transtornos psicóticos e medicações como agentes antiglutamatérgicos e depletors dopaminérgicos para controle dos sintomas motores (MIGUEL et al., 2012).

Como esta doença não tem cura, os fármacos utilizados para diminuir os sintomas nem sempre melhoram a qualidade de vida dos indivíduos, gerando, algumas vezes, maior quantidade de eventos adversos do que os efeitos desejáveis (MIGUEL et al., 2012). O conhecimento de doenças autossômicas dominantes como a DH, onde a presença da proteína mutante é o processo desencadeador da doença, tem estimulado a busca do silenciamento de genes como potencial caminho terapêutico (SHIN et al., 2016). Uma abordagem promissora é utilizar editores genéticos como ZFN (Nucleases de dedo de zinco), TALEN (Nucleases efetoras tipo ativador de transcrição) e sistemas baseados em CRISPR (Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas), pois estas ferramentas biotecnológicas têm a capacidade de alterar diretamente as sequências de DNA e, conseqüentemente, alterar a expressão dos genes alvo (MALANKHANOVA et al., 2017).

Estudos demonstram que a redução da expressão de HTT mutante em células neuronais estriatais de camundongos alivia seus déficits motores e sintomas neurológicos, sugerindo que a diminuição de HTT por editores genômicos pode eliminar de forma eficiente e permanente a toxicidade neuronal mediada pela expansão do polyQ no cérebro adulto (YANG et al., 2017). Demonstram, portanto, que são fontes promissoras para a terapia gênica de pacientes que possuem a DH (MALANKHANOVA et al., 2017).

2 OBJETIVO

Realizar uma revisão bibliográfica, analisando e discutindo as informações mais recentes sobre a Doença de Huntington e edição do alelo mutante por meio das tecnologias Zinc Finger Nuclease, TALEN e CRISPR/Cas9.

3 METODOLOGIA

Este trabalho trata-se de um estudo descritivo, por meio de revisão bibliográfica, sem metanálise, caracterizada na modalidade denominada revisão integrativa.

As informações que compõe esta revisão bibliográfica, foram obtidas por meio de artigos científicos, pertencentes às bases de dados: Revista Eletrônica Scielo, PubMed e Google Acadêmico, nos idiomas português, inglês e espanhol, no período de 1994 a 2019, utilizando os marcadores booleanos: or, and e not.

Ao longo da pesquisa, foram utilizadas as seguintes palavras chave: 1. Doença de Huntington 2. Nucleases de dedos de zinco 3. Nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição 4. Reparo do DNA 5. Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas

4 DESENVOLVIMENTO

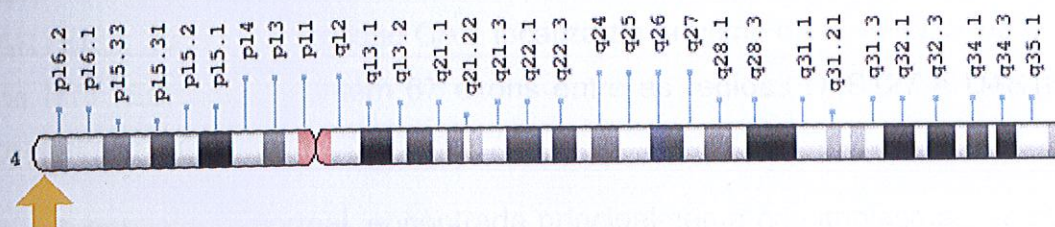
4.1 Gene HTT

Localizado no braço curto do cromossomo 4, na posição 16.3 (4p16.3), o HTT, também chamado de IT15, é o gene relacionado à Doença de Huntington (Figura 1). Seu locus mede cerca de 180 kb, contendo 67 exons e é amplamente expresso, importante para o desenvolvimento normal (GENBANK, 2019). Normalmente, o HTT possui repetições de trinucleotídeos CAG que codificam um trecho de poliglutamina (poliQ), sendo repetida de 9 a 35 vezes, com média entre 17 e 20 repetições (SAUDOU; HUMBERT, 2016).

A proteína transcrita, chamada huntingtina é solúvel, contém 3.144 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 350kDa. É expressa nas células de todos os mamíferos e, normalmente, está localizada no citoplasma de células somáticas e neurônios. As concentrações mais altas são encontradas no cérebro e testículos, com concentrações moderadas no fígado, coração e pulmões (GONÇALVES, 2013). É uma proteína citoplasmática essencial durante o desenvolvimento na gástrula, neurogênese e, em adultos, para sobrevivência neuronal (SAUDOU; HUMBERT, 2016).

Esta proteína está associada ao fator neurotrófico induzido pelo cérebro (BDNF), proteína produzida pelo córtex cerebral, importante para sobrevivência dos neurônios do estriado e a atividade da sinapse córtico-estriatal. Também está envolvida na maquinaria celular que controla a transmissão sináptica, no transporte de diversas vesículas ao longo de microtúbulos (proteínas do citoesqueleto) e proteínas que são essenciais para a exocitose e endocitose nos terminais sinápticos (CATTANEO; ZUCCATO; TARTARI, 2005).

Figura 1- Localização cromossômica do gene HTT

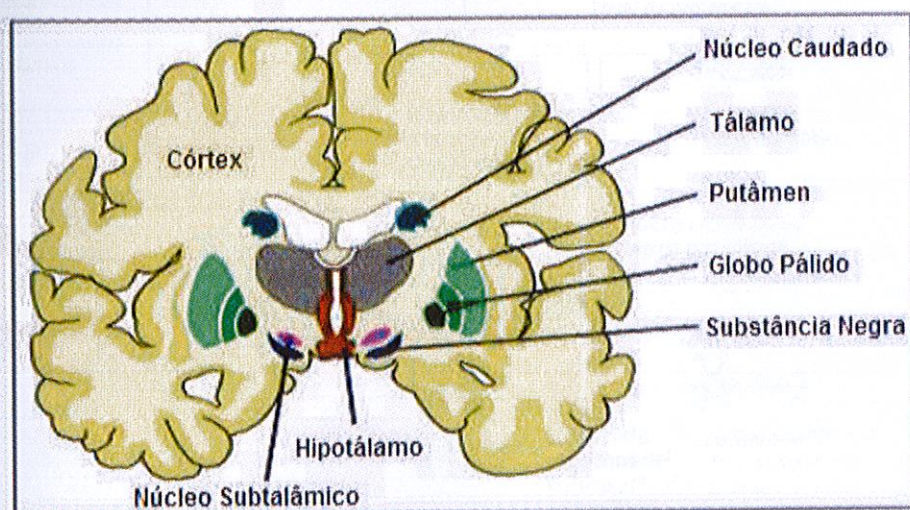


Fonte: (GENBANK, 2019)

4.2 Fisiopatologia da Doença de Huntington

A Doença de Huntington envolve a perda prevalente de neurônios espinhosos eferentes médios (MSNs) no estriado (núcleo caudado e putâmen) dos gânglios da base, bem como mais degeneração em todo o córtex e, por fim, o hipocampo (Figura 2) (GLORIOSO et al., 2015). Devido a isto, os primeiros sinais da doença são sutis como movimentos inquietos dos dedos das mãos e dos pés durante um período de estresse ou durante a marcha, dificuldades na resolução de problemas, irritabilidade e depressão (MARTELLI, 2014).

Figura 2 – Estruturas cerebrais afetadas na Doença de Huntington



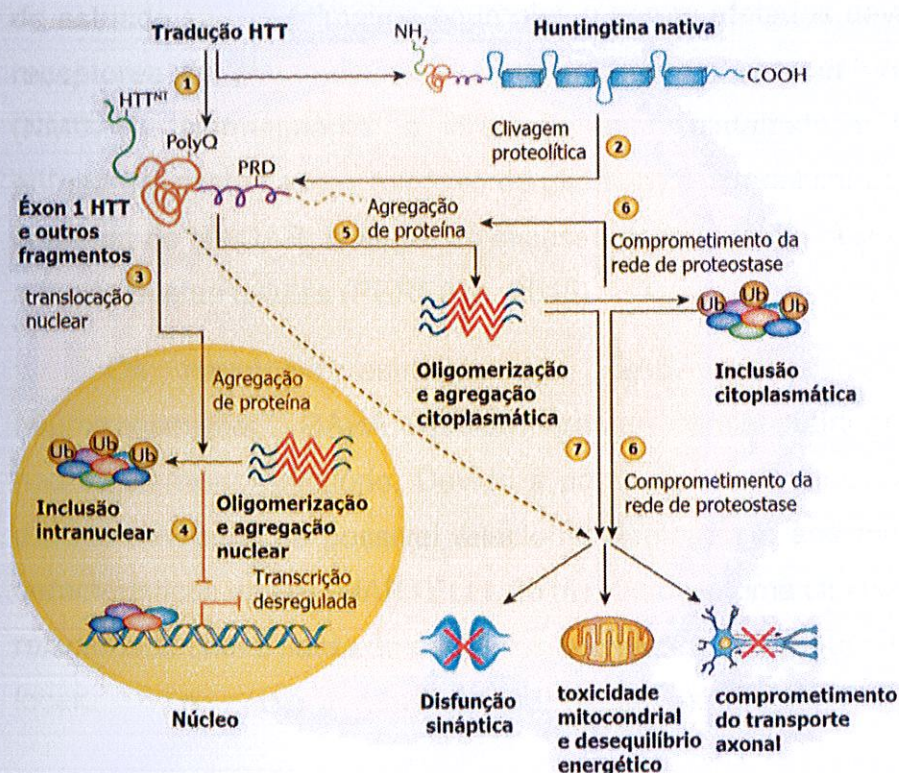
Fonte: Modificado de (MARTELLI, 2014)

A alteração genética na DH é uma expansão da repetição do trinucleotídeo citosina-adenina-guanina (CAG) no cromossomo 4 (4p16.3) que codifica repetições

de poliglutamina na proteína huntingtina, a qual, acredita-se, ocasione um ganho de função, desencadeando o processo neurodegenerativo característico desta doença (MARTELLI, 2014). A repetição CAG localiza-se próximo do terminal 5' do éxon 1 do gene HTT. Este gene contém 67 éxons entre as regiões D4S127 e D4S180 (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011).

A huntingtina normal, encontrada principalmente no citoplasma, é crucial para a sobrevivência de MSNs específicos dentro do corpo estriado devido à sua atividade antiapoptótica e importante papel na manutenção do funcionamento adequado dos neurônios (GLORIOSO et al., 2015). O comportamento da HTT mutante ainda não é completamente compreendido, no entanto, sabe-se que é tóxico para vários tecidos, particularmente o cérebro (GONÇALVES, 2013).

Figura 3 - Mecanismo celular fisiopatológico na Doença de Huntington



PRD, domínio rico em prolina; Ub, ubiquitina

Fonte: Modificado de (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017)

Em sua forma alterada, o gene HTT é traduzido para produção da proteína huntingtina, bem como o fragmento do exon 1 do terminal amino (local onde ocorre a mutação). A proteína produzida será clivada por proteólise para geração de fragmentos proteicos adicionais e, estes fragmentos entrarão no núcleo, ocasionando a auto associação, oligomerização e agregação, levando à formação de inclusões, um processo que causa desregulação transcricional através do sequestro de outras proteínas e através de outros mecanismos que não estão totalmente elucidados. Os fragmentos da huntingtina também sofrerão oligomerização no citoplasma e formação de agregados neste local. Todo este processo resultará em disfunção sináptica, toxicidade mitocondrial e uma taxa reduzida de transporte axonal (Figura 3) (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

A disfunção intracelular induzida pela huntingtina mutante, ao longo da progressão da doença, leva à perda de células no estriado, córtex cerebral e à degeneração de vias neurais de extrema importância (MARTELLI, 2014). Os MSNs do estriado são os primeiros neurônios a serem afetados devido à alta presença de receptores de glutamato, o N-metil-ionotrópicos D-receptores do ácido aspártico (NMDAR). Normalmente, a interação entre glutamato e NMDAR é transitório, entretanto, neste caso, o excesso de glutamato extracelular pode levar a estimulação contínua de NMDAR, levando ao excesso de influxo de cálcio e, conseqüentemente, a morte destas células (PEREIRA, 2015).

Os neurônios estriatais são GABAérgicos e utilizam, portanto, o neurotransmissor GABA (ácido gama- aminobutírico), sendo este, um neurotransmissor inibitório. Devido a perda do efeito inibitório causada pela morte desses neurônios, é possível relacionar diretamente aos movimentos involuntários característicos da DH (MARTELLI, 2014). Já o sintoma clínico de demência, tem sido relacionado com a perda de neurônios secretores de Ach (acetilcolina), provavelmente localizados no córtex cerebral (PEREIRA, 2015).

4.3 Manifestações Clínicas

Inicialmente, os indícios da doença são sutis sendo observadas alterações na execução de movimentos, irritabilidade, dificuldade na resolução de problemas e depressão (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011). O início ocorre, em média, aos quarenta

anos, quando o paciente apresenta movimentos involuntários do tipo coreia, declínio cognitivo e alterações psiquiátricas. Caso os sintomas iniciem após os 50 anos, é definida como tardia (SPITZ, 2010).

Cerca de 90% dos afetados possuem coreia, que é o sinal motor mais proeminente, sendo estes movimentos involuntários presentes continuamente durante o período que o portador está em alerta, não sendo capazes de suprimi-los (CHEMALE et al., 2000). Outros sinais estão presentes, como incapacidade de fechar os olhos e retraindo a língua, bradicinesia, disfagia e disartria (SPITZ, 2010).

Pacientes com DH têm sua capacidade cognitiva afetada de forma progressiva, sendo o declínio intelectual um dos primeiros sinais deste déficit, aparecendo até mesmo antes da coreia. As alterações cognitivas se agravam ao longo dos anos, fazendo com que o paciente apresente demência severa. Apresentam também alterações de personalidade e comportamento maníaco depressivo (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011). O óbito ocorre após um período médio de 15 a 20 anos, sendo a principal causa de morte a pneumonia aspirativa, devido a imobilidade e disfagia (SPITZ, 2010).

4.4 Diagnóstico Molecular

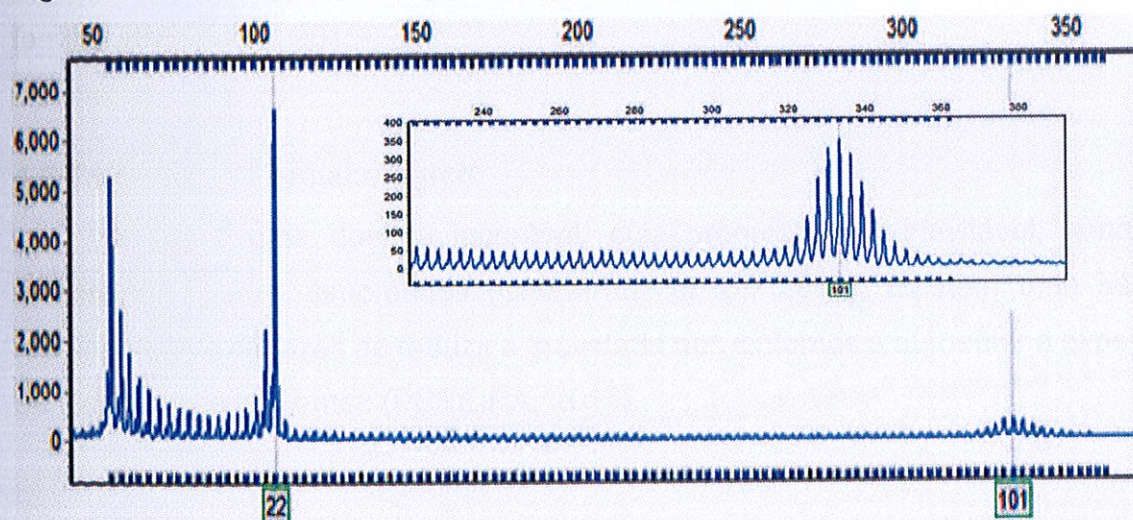
O diagnóstico pode ser feito em indivíduos que apresentam sintomatologia e têm histórico familiar da doença ou por meio de testes genéticos. O teste molecular da DH consiste em uma análise das células sanguíneas utilizando a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para contagem do número de repetições CAG em cada alelo da HTT e posteriormente, análise dos fragmentos gerados (amplicons) (GONÇALVES, 2013).

Desta forma, os linfócitos periféricos têm seu DNA isolado e, posteriormente, é feita amplificação da repetição CAG utilizando a técnica de PCR convencional. Esta é feita utilizando primers conhecidos como HD1 5'-TGGCGACCCTGGAAAAGCTGAT-3'; e HD3 5'-GCGGTGGCGGCTGTTGCTGCT-3' (CHEMALE et al., 2000). Após a amplificação, é utilizado um primer marcado com fluorescência para determinar os tamanhos dos alelos. A técnica consiste na eletroforese capilar, utilizando um sistema de genotipagem automatizado (Figura 4) (MARGOLIS; ROSS, 2003). Esta técnica

apresentou maior precisão na determinação do tamanho das expansões CAG quando comparados aos resultados da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (APOLINARIO et al., 2013). Para análise dos dados gerados pela eletroforese capilar pode-se utilizar o software GeneMarker (SILVA; AGOSTINHO; PAIVA, 2013). Pode ser feita uma relação entre o tamanho do fragmento de PCR e o número de repetições CAG determinado por Sequenciamento automático (Figura 5) (PAVÓN-REALPE et al., 2014).

Em alelos normais, o comprimento dos produtos de PCR está na faixa de 140-211 pb (11 a 34 repetições de CAG), já os alelos mutantes da DH, está na faixa de 226-472 pb (39 a 121 repetições de CAG). O diagnóstico molecular utilizando a técnica de PCR é uma maneira precisa para confirmação da presença do alelo mutante, bem como de outras doenças onde as sequências do gene e mutação são conhecidas (ASCARI; GHISI, 2015).

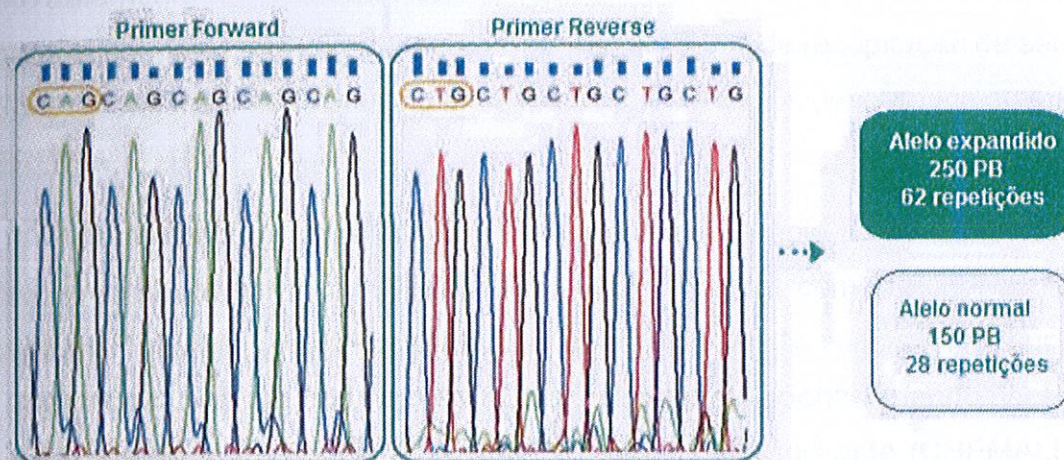
Figura 4- Eletroferograma da genotipagem da DH



O eletroferograma demonstra alelos com 22 e 101 repetições de CAG. O eletroferograma sobreposto mostra o pico mais proeminente no meio, com uma amostra com genótipo de 101 repetições de CAG.

Fonte: Modificado de (JAMA et al., 2013)

Figura 5 - Análise do tamanho dos amplicons por meio de Sequenciamento Automático de DNA



Fonte: Modificado de (PAVÓN-REALPE et al., 2014)

Portanto, o teste genético é indicado para pacientes sintomáticos, que possuem sintomas neurológicos característicos da DH, com ou sem história familiar positiva, mas também é indicado para pacientes assintomáticos que possuem história familiar positiva e queiram saber os riscos de desenvolver a doença para planejamento familiar (PEREIRA, 2015).

4.5 Tratamento Farmacológico

A DH é uma doença incurável, cuja progressão é inevitável, sendo seu tratamento apenas sintomático (CHEMALE et al., 2000). Existem uma série de medicamentos capazes de reduzir a gravidade dos sintomas e aumentar a expectativa de vida desses pacientes (PEREIRA, 2015).

A terapia farmacológica consiste na utilização de drogas bloqueadoras dos receptores dopaminérgicos, como as fenotiazinas ou o haloperidol para controle da discinesia e alguns distúrbios comportamentais (CHEMALE et al., 2000). Aprovado em 2008 para comercialização pelo FDA (*Food and Drugs Administration*), a Tetrabenazina, é um medicamento inibidor do transporte de monoaminas no cérebro, ou seja, dopamina, serotonina e noradrenalina, mas com maior efeito sobre a dopamina, demonstrou uma redução significativa da coreia (GONÇALVES, 2013).

Os sintomas psicóticos, quando existentes, podem ser tratados com neurolépticos, todavia, as repostas nem sempre são satisfatórias. Já transtornos de

ansiedade, irritabilidade e alterações no humor, são utilizados os benzodiazepínicos como tratamento. Em pacientes com DH que possuem depressão, o tratamento é feito com os antidepressivos da classe de inibidores seletivos da recapitação de serotonina – ISRS (fluoxetina e sertralina) ou antidepressivos tricíclicos (imipramina e amitriplina) (PEREIRA, 2015).

Apesar da diminuição dos sintomas, nenhuma terapia farmacológica atrasa o curso natural da doença (PEREIRA, 2015). Drogas como bloqueadores dos receptores dopaminérgicos podem induzir um quadro de discinesia tardia superposta ao distúrbio crônico, devendo, portanto, serem utilizados apenas quando necessários, ou seja, quando a coreia se tornar funcionalmente incapacitante (CHEMALE et al., 2000). A tetrabenazina, apesar do efeito anticoreico na maioria dos pacientes, foi observado interação medicamentosa com antidepressivos tricíclicos, os quais acentuam os efeitos adversos da TBZ (PEREIRA, 2015). Houve também aumento da deterioração cognitiva, alterações do sono, ansiedade, depressão e agitação (GONÇALVES, 2013).

4.6 Editores de genoma

O aprimoramento de novas tecnologias na última década permitiu aos cientistas manipular diretamente o genoma de diversos organismos. Baseadas no uso de nucleases modificadas, os editores do genoma, como são conhecidos, possibilitam modificações genéticas e eficientes por meio de quebras da dupla fita de DNA (DSBs) e mecanismos de reparo do DNA celular, incluindo Reparo dirigido por homologia (HDR) e Junção de extremidades não homologas (NHEJ) (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013).

O uso destas ferramentas facilitou a geração de modelos *knockout* ou *knock-in* de loci-alvo para que houvesse o avanço de estudos da função de genes, criar modelos com doenças hereditárias e o desenvolvimento de tratamento (MALANKHANOVA et al., 2017).

Editores como *Zinc Finger Nuclease* (ZFN), *Transcription activator-like effector nuclease* (TALEN) e Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR Cas9) foram desenvolvidas para atuar na edição em um local específico do genoma, onde o reconhecimento dos sistemas ZFN e TALEN

alcançam o DNA alvo por meio da interação DNA-proteína, enquanto a Cas9 reconhece a sequência de corte por uma molécula curta de gRNA que possui uma sequência complementar ao DNA alvo (COX; PLATT, ZHANG, 2015).

O ZFN é constituído por duas partes: a primeira possui de 3-4 domínios de dedo de zinco (ZFPs) e a segunda é o domínio FokI. O TALEN também possui o domínio FokI, entretanto, os domínios de ligação ao DNA consistem em monômeros contendo repetições em *tandem* de 34 aminoácidos, sendo dois deles variáveis (nas posições 12 e 13) e responsáveis pelo reconhecimento dos nucleotídeos. O sistema CRISPR também consiste de dois elementos, mas, diferentemente do ZFN e TALEN, o CRISPR/Cas9 possui um gRNA que contém 20 nucleotídeos complementares ao DNA alvo e a nuclease Cas9. Para que haja o corte, a Cas9 requer não apenas o complexo RNA-DNA, mas também a presença de uma sequência PAM (MALANKHANOVA et al., 2017).

Podemos observar que, nos últimos 25 anos, tivemos uma grande evolução no que diz respeito a edição genética. Métodos que utilizam a edição do DNA, como o dedo de zinco, teve seu início nos anos 90 (BAILUS; ZHANG; ELLERBY, 2017). Posteriormente, houve o refinamento do ZFN, fornecendo um modelo para o aperfeiçoamento da engenharia genômica da próxima geração – TALEN e CRISPR/Cas9 (WIRTH; PARKER; HERTTUALA, 2013).

A utilização de nucleases em locais específicos para fins terapêuticos retrata uma transformação no paradigma na terapia genética, pois, contrariamente de outros métodos, como, por exemplo, o RNA de interferência (RNAi), que trata temporariamente os sintomas da doença, o ZFNs, TALENs e CRISPR são capazes de corrigir a causa central da doença, fazendo com que haja eliminação permanente dos sintomas devido a modificações precisas no genoma (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013).

4.6.1 Histórico

Com o início em 1972, a engenharia genética surgiu no laboratório de Paul Berg com a tecnologia de DNA recombinante, oriundas da combinação do genoma de *E. coli* com os genes de um bacteriófago e o vírus SV40. Por conta disto, tornou-se um sucesso e permitiu que os mecanismos moleculares fossem reproduzidos *in vitro*, estudados e aperfeiçoados. Também permitiu o desenvolvimento de métodos para manipular o DNA e gerar diversos vetores, fazendo com que houvesse a produção de microorganismos transgênicos, plantas e animais geneticamente modificados (NEMUDRYI et al., 2014).

Demonstrado pela primeira vez em 1996, o dedo de zinco acoplado a endonuclease FokI foi utilizado para clivar sítios específicos de DNA previamente definidos *in vitro*. Isto ocorreu quando Chandra utilizou, pela primeira vez, a tripsina, uma enzima digestiva para clivar a FokI. Houve então a produção de uma nuclease indiscriminada que foi “cortando” o DNA. Ao observar esse efeito, Chandra decidiu experimentar uma proteína dedo de zinco e foi visitar Jeremy Berg, que estava desenvolvendo diversos projetos de novos dedos de zinco. Ele a entregou um plasmídeo que codificava um dedo de zinco. Ela então o utilizou para criar duas proteínas de fusão, combinando cada motivo de ligação com o domínio de FokI (KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996).

Os primeiros experimentos com o ZFN demonstraram a capacidade da nuclease em reconhecer e clivar o DNA em locais específicos. Tal experimento foi realizado em óocitos de *Xenopus laevis*, onde os substratos de DNA modificados bem como as nucleases foram injetados no núcleo e, posteriormente, observado a clivagem do DNA e recombinação homóloga (BIBIKOVA et al., 2001). A primeira edição de sucesso utilizando um par de ZFN foi em *Drosophila* e, tanto a substituição gênica direcionada como a mutagênese direcionada foram demonstradas no Locus *yellow* de células somáticas e na linha germinativa. Após esse feito, os ZFNs foram projetados com sucesso para a edição de genes individuais para uma série de células e organismos (CARROLL, 2011). Esta tecnologia permitiu a produção dos primeiros camundongos knockout do mundo pelo pesquisador Geurts e colegas (GEURTS ET AL., 2009).

A tecnologia baseada em ZFN, entretanto, possui algumas desvantagens, dentre elas, a complexidade, alto custo para ser projetado e clivagem imprecisa do

DNA por conta de interação inadequada entre domínios ou a substituição de nucleotídeo único (NEMUDRYI et al.,2014). Nos últimos 15 anos, os pesquisadores tentaram otimizar os ZFN e, com isso, foi identificado um motivo de ligação ao DNA, que são proteínas conhecidas como efetores do tipo ativador de transcrição (TALEs) (BAKER, 2012).

Representantes da maior família de efetores do tipo III de *Xanthomonas* spp, grupo de bactérias Gram-negativas que são patógenos de plantas, os TALEs, inicialmente, tinham o papel como fatores de patogênese de plantas, no entanto, seu simples código de ligação ao DNA e a facilidade de ser projetado, levou à sua aplicação como fator de transcrição artificial e nuclease (WRIGHT et al., 2014). O que leva esta bactéria a ser um patógeno de plantas cultivadas como arroz, tomate e pimenta, é a secreção de proteínas efetoras do tipo TALEs para o citoplasma das células vegetais, que acabam por afetar os processos naturais da célula vegetal e aumentam sua suscetibilidade ao patógeno. Com isto, causam danos econômicos significativos à agricultura, o que motivou seu aprofundamento. Por este motivo, em 2011, a *Nature Methods* incluiu o sistema TALEN aos métodos de edição precisa do genoma, sendo este, o método do ano. Ao investigar os mecanismos de ação das proteínas efetoras, foi revelado que estas são capazes de se ligar ao DNA e ativar a expressão de seus genes alvo por meio dos fatores de transcrição de células eucarióticas (NEMUDRYI et al.,2014).

Apesar de ocorrer o reconhecimento de cada base nitrogenada entre a ligação de TALE- DNA, que proporciona maior flexibilidade de design do que o ZFN, que reconhece um triplete, foi observado que a clonagem de arranjos de TALE demonstra um grande desafio técnico e além disso, possui a limitação de que o sítio de ligação TALE deve começar com uma base T (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013).

Como alternativa potencialmente eficiente e de fácil manipulação, o CRISPR/Cas9, diferentemente dos editores ZFN e TALEN, surgiu para induzir alterações genéticas direcionadas (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013).

Descrita por japoneses em 1987, durante uma análise de genes envolvidos no metabolismo do fosfato, foi identificada uma sequência repetitiva incomum de DNA no genoma de *Escherichia coli* (ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018). Relatado em 1993, Francisco Mojica foi o primeiro pesquisador que caracterizou o que hoje é chamado de locus CRISPR. Mojica trabalhou com uma arqueobactéria halofila,

Haloferax mediterranei, onde encontrou múltiplas cópias de uma sequência repetitiva, palindrômica, de 30 pares de bases, estas separadas por espaçadores de aproximadamente 36 pares de bases, que não eram semelhantes a nenhuma repetição conhecida em bactérias (LANDER, 2016).

Horvath e colegas, incluindo Rodolphe Barrangou, utilizando uma estirpe de *S. thermophilus* (usadas para produção de produtos lácteos, como queijo e iogurte) desenvolveram métodos baseados em DNA para entender como certas cepas de *S. thermophilus* se protegem do ataque de fagos, infecções que atormentavam as culturas industriais usadas na fermentação láctea (LANDER, 2016). Em 2007, eles comprovaram, experimentalmente, a função do CRISPR como sistema imune adaptativo em procarionto, onde a inserção da sequência de fago na região espaçadora da CRISPR de *S. thermophilus* tornou esta estirpe resistente ao fago correspondente (ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018). Eles também estudaram o papel do gene *cas*. As bactérias necessitavam de um mecanismo para ganhar resistência e observou que a Cas9, cuja sequência continha dois tipos de motivos nucleases (HNH e RuvC) e cujo produto presumivelmente cortava os ácidos nucleicos foi necessário para resistência a fagos. A proteína Cas9 foi um componente ativo do sistema imune bacteriano (LANDER, 2016).

Em 2012, caracterizações bioquímicas dos grupos de Charpentier, Doudna e Siksnyts demonstraram que um único RNA guia (sgRNA) pode ser construído com a junção de um crRNA contendo a sequência guia de direcionamento a um tracrRNA que facilita a clivagem do DNA por Cas9 *in vitro* (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). Utiliza-se então um RNA guia pequeno (sgRNA) contendo uma sequência de 20 nucleotídeos complementar ao DNA alvo e nucleases Cas9 para clivagem específica do local de um alvo genômico contendo um Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM) (DABROWSKA et al., 2018).

A partir de 2013, muitos estudos mostraram, simultaneamente, como projetar com sucesso o sistema CRISPR Cas9 tipo II de *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus pyogenes* para realizar edição do genoma em células de mamíferos. E desde então, o sistema CRISPR-Cas9 tem sido utilizado em inúmeros laboratórios para edição do genoma em diversos modelos experimentais (HSU; LANDER; ZHANG, 2014) como, por exemplo, leveduras, mosca das frutas, nematoide, peixe zebra, camundongos e macacos. O interesse científico e comercial para uma possível

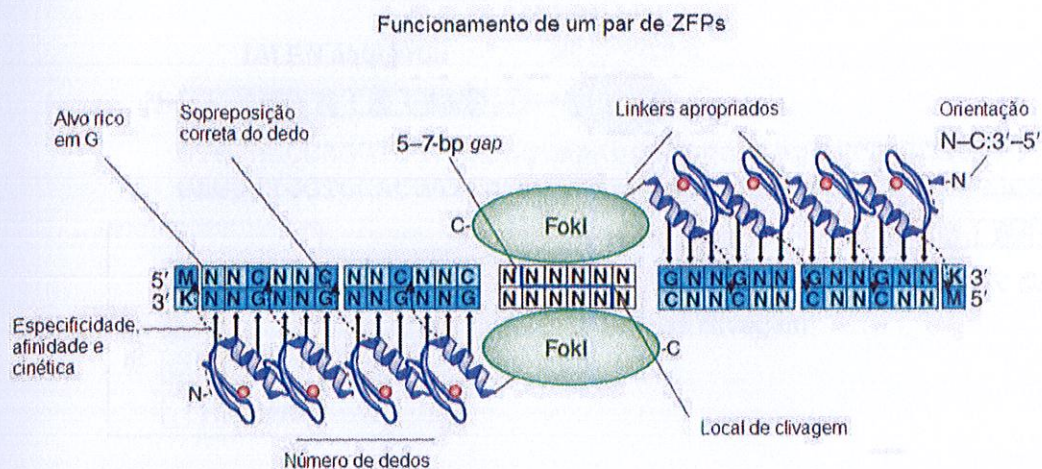
aplicação terapêutica humana e na agricultura vem crescendo nos últimos anos (LANDER, 2016).

4.6.2 Zinc Finger Nuclease

As nucleases dedo de zinco são fusões do domínio de clivagem de DNA não específico da endonuclease de restrição FokI com proteínas de dedo de zinco (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013). Desta forma, cada dedo de zinco irá reconhecer três nucleotídeos do DNA por meio da interação de proteínas alfa-hélice e bases do DNA. Para que ocorra o reconhecimento de uma sequência específica do DNA, estes dedos de zinco serão ligados um ao outro, contendo um grupo de seis dedos de zinco para o reconhecimento de 18 nucleotídeos (BAILUS; ZHANG; ELLERBY, 2017). A configuração ótima usa um *linker* curto entre os domínios da proteína e um espaçador de 5 ou 6 nt entre os locais de ligação que estão na orientação e ocorre de forma similar na fita inversa. O domínio de clivagem de FokI deve dimerizar para cortar o DNA (Figura 6) (CARROLL, 2011). Após o corte do DNA, são estimuladas as vias de resposta a danos no DNA. A especificidade de ligação do domínio do dedo de zinco projetado direciona o ZFN para um local genômico específico (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013).

Para que houvesse inovação das ferramentas da engenharia genômica, o aprimoramento posterior das ZFNs forneceu um modelo para a próxima geração de editores como TALENs e CRISPR/Cas9. Um exemplo são os domínios catalíticos da FokI que foram modificados para, primeiramente, atender as aplicações do ZFN e posteriormente, adaptados para TALENs onde, versões heterodiméricas da FokI diminuiu significativamente os efeitos fora do alvo (LEE et al., 2016).

Figura 6 – Estrutura e funcionamento do ZFN



A figura mostra, de maneira esquemática, dois pares de ZFN contendo quatro pares de dedos ligados ao DNA alvo e o domínio FokI. Os locais de ligação dos dedos de zinco ao DNA estão demonstrados em azul escuro.

Fonte: Modificado de (ISALAN, 2012)

4.6.3 TALEN

Os TALEs são proteínas que, espontaneamente, interagem com o DNA na transcrição. De ocorrência natural do gênero de bactérias *Xanthomonas*, presente em plantas, este contém domínios de ligação ao DNA formado por uma série de 33-35 resíduos de aminoácidos, sendo que cada um reconhece um único nucleotídeo (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013). Para que ocorra o reconhecimento específico de cada nucleotídeo, o sistema possui resíduos de aminoácidos presentes nas posições 12 e 13 que são chamados de di-resíduos variáveis da repetição (DVRs) (SOUZA, 2017). Estes DVRs, tais como como asparagina e isoleucina, asparagina e glicina, duas asparaginas, histidina e aspartato ligam-se aos nucleotídeos A, T, G, C, respectivamente no DNA alvo (MALANKHANOVA et al., 2017). Assim como o ZFN, o TALEN também é fusionado com a endonuclease FokI (SOUZA, 2017).

Para que haja o corte do DNA alvo, duas subunidades dos domínios de ligação são associadas a sequência molde e outro a sequência complementar do DNA, a uma distância de 12-20 nt (sequência espaçadora) e os monômeros de FokI próximos para que possam dimerizar e produzir a clivagem da dupla fita de DNA (Figura 7) (MALANKHANOVA et al., 2017).

Figura 7- Estrutura TALEN

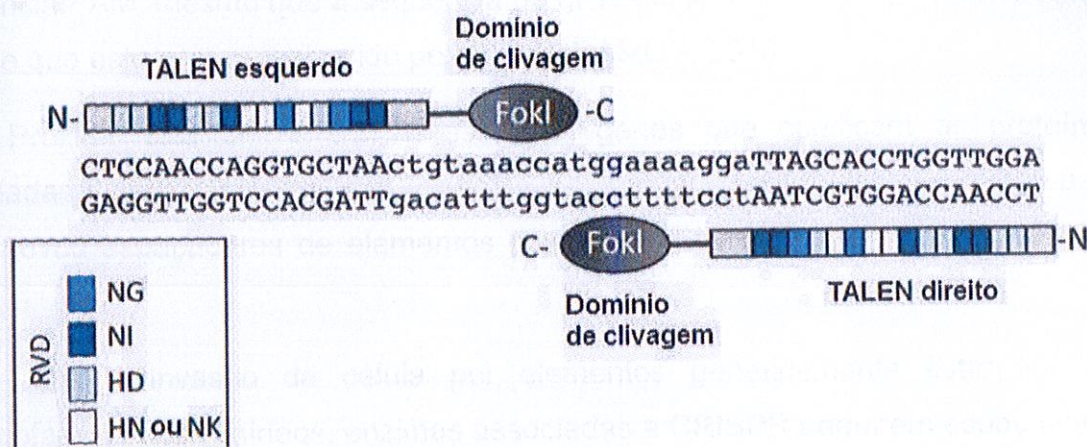


Figura de um dímero de nucleases TALEN ligadas ao DNA. Esses TALENs são separados por um espaçador de comprimento variável (12-20 nt). São projetados para reconhecer metade dos sítios da esquerda e da direita. Composições RVD são indicadas.

Fonte: Modificado de (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013)

4.6.4 CRISPR/Cas9

Trata-se de um mecanismo do sistema imune adaptativo presente na maioria das arqueobactérias e 40% das bactérias para protegê-las da invasão viral, que pode conter como alvo sequências específicas de ácidos nucleicos estranhos. O CRISPR consiste em sequências curtas e palindrômicas que se repetem e sequências que codificam a proteína Cas (KOLLI et al., 2018). A memória imunológica adquirida manifesta-se após o DNA ser cortado em fragmentos menores e incorporado no locus CRISPR, passando a chamar-se de protoespaçador (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Para facilitar o processo em laboratório, o duplex de tracrRNA-crRNA foi projetado como *single guide RNA* (sgRNA) que possui duas características essenciais: a sequência de 20 nucleotídeos na extremidade 5' que determina o pareamento com o DNA alvo e a estrutura de fita dupla na extremidade 3' que se liga a Cas9 (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

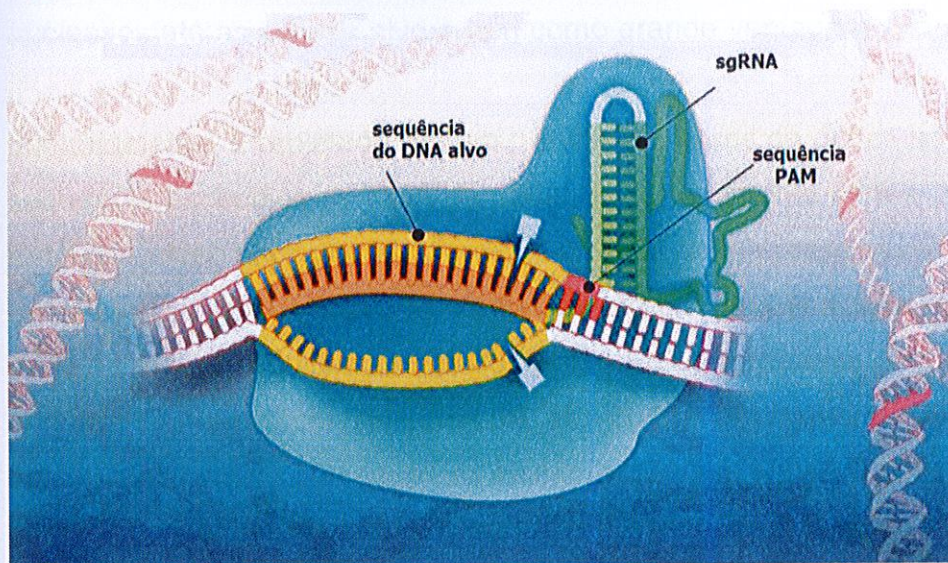
O *protospacer adjacent motif* (PAM), é uma sequência nucleotídica curta presente no DNA alvo, que desempenha um papel importante para a afinidade em relação ao alvo e no desenrolar do duplex (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012). Por meio de interações existentes entre a Cas9 e a PAM, resulta a separação da dupla

fita de DNA, permitindo, sucessivamente, a clivagem. A inexistência de uma sequência PAM, mesmo que a sequência do gRNA seja complementar ao DNA alvo, impede que este seja reconhecido pela Cas9 (RAMOS, 2016).

Próximo à matriz CRISPR, estão os genes que codificam as proteínas associadas a CRISPR (Cas), que fornecem o maquinário enzimático necessário para obter novos espaçadores de elementos invasores (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

Após a invasão da célula por elementos geneticamente estranhos de bacteriófagos ou plasmídeos, enzimas associadas a CRISPR adquirem espaçadores das sequências exógenas e as instalam no locus CRISPR dentro do genoma procariótico. Esses espaçadores são segregados entre repetições diretas que permitem que o sistema CRISPR faça o reconhecimento de si mesmo e não-próprio (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). O locus CRISPR é transcrito em uma cadeia precursora de RNA não codificante (pré-crRNA) que são então processados em crRNAs maduros. Ocorre uma hibridização das cadeias repetidas de crRNA com *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA) que é outro RNA não codificante. Devido a esta hibridização, é formado uma cadeia dupla de RNA, que então é clivada e processada pela Ribonuclease III (RNase III). Posteriormente, o duplex formado por crRNA-tracrRNA irá associar-se com a nuclease Cas9, formando, portanto, o sistema que será responsável por reconhecer e clivar o DNA invasor em células procarióticas e *in vitro* (RAMOS, 2016). Este complexo formado tem especificidade para o ácido nucleico invasor e, por complementariedade, irá guiar a Cas9 ao local de degradação. Ocorre então a quebra da dupla fita de DNA, por domínios enzimáticos como HNH, que cliva a fita complementar do DNA, e RuvC cliva a fita de DNA não complementar ao gRNA (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012). Este processo de quebra da dupla fita de DNA só é realizado caso a sequência alvo estiver na região adjacente a uma pequena sequência conhecida como *protospacer adjacent motif* (PAM) (Figura 8) (RAMOS, 2016). As clivagens na dupla fita de DNA são consertadas por mecanismos de reparo não homólogos (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR) (SHIN; LEE, 2018).

Figura 8 – Estrutura CRISPR/Cas9



A enzima Cas9 (azul), irá clivar a dupla fita de DNA utilizando seus dois sítios catalíticos para quebrar cada fita de DNA (em amarelo) em um local específico adjacente à sequência PAM (vermelho) juntamente com o gRNA, sequência de 20 nt (laranja). Este sgRNA inclui uma sequência de RNA duplo proveniente do crRNA (verde claro) e um transcrito chamado de tracrRNA (verde escuro) que se liga e estabiliza a proteína Cas9.

Fonte: Modificado de (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014)

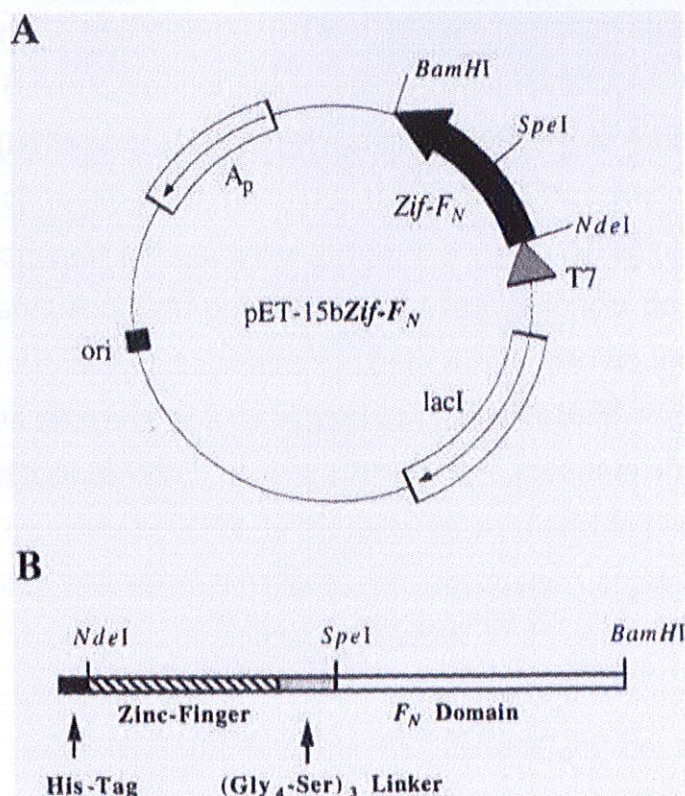
4.7 Expressão da nuclease e métodos de entrega para a célula

Para introdução do material genético terapêutico à célula alvo são utilizados vetores, que são divididos em virais e não virais (OLIVEIRA et al., 2018). Existem diversos métodos de entrega do material genético para que sejam introduzidas as nucleases de edição do genoma em células, seja *in vitro* ou *in vivo*. Dependendo do método de escolha, essas nucleases poderão ser expressas de forma transitória ou permanente na célula alvo (COX; PLATT; ZHANG, 2015).

Um dos vetores não virais que são altamente utilizados são os plasmídeos, que possuem fragmentos de DNA circular e sua existência independe de células bacterianas. Estes podem ser transfectados de uma bactéria para outra, bem como incorporado em células eucariotas, permitindo a expressão e tradução da proteína de interesse nessas células (OLIVEIRA et al., 2018).

Os plasmídeos consistem nos meios mais utilizados para o transporte de nucleases até as células alvo e tem como grande vantagem a fácil produção *in vitro* (RAMOS, 2016). Para que haja a expressão dos dedos de zinco pela célula, primeiramente, é projetado em um plasmídeo, pares de dedos de zinco que visam a sequência específica do DNA da célula alvo juntamente com a endonuclease FokI. Este plasmídeo será clonado para que a célula de interesse passe a expressar o ZFN (KANDAVELOU et al., 2009). A construção do TALEN é feita da mesma maneira, onde o DNA que codifica as repetições TALEN são clonadas em um vetor juntamente com a nuclease FokI (MILLER et al., 2010). No sistema CRISPR/Cas9 esses plasmídeos contêm dois cassetes de expressão: um para a Cas9 e outro para o gRNA com 20 nucleotídeos. Após expressar a proteína de interesse, este plasmídeo será transfectado na célula alvo por eletroporação (RAMOS, 2016). Pode também, inserir elementos adicionais como a GFP (*Green Fluorescent Protein*) para, posteriormente, selecionar as células que receberam o plasmídeo (NEMUDRYI et al., 2014).

Figura 9 – Construção do plasmídeo para expressão do ZFN

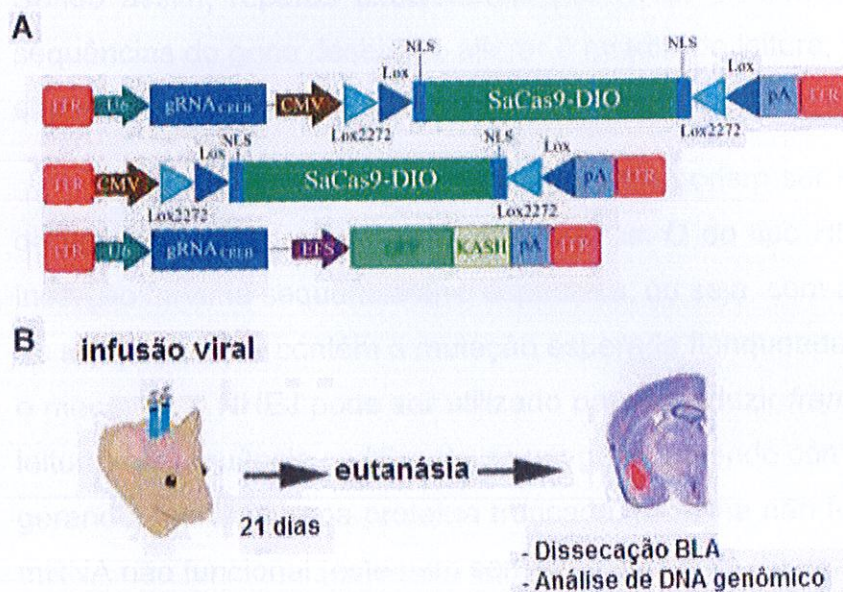


Fonte: (KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996)

Existem também os vetores virais que são os métodos de entregas mais promissores para utilização *in vivo*. (COX; PLATT; ZHANG, 2015). Atualmente, os vetores virais mais comumente usados são os AAVs (vírus adeno-associados), sendo estes, de natureza não integradora e também não são patogênicos (KOLLI et al., 2018). Os AAVs demonstraram alta eficácia na entrega para uma variedade de tecidos como olhos, fígado, músculo e cérebro devido seu amplo tropismo celular. Com isto, foram recentemente aprovados para uso clínico (COX; PLATT; ZHANG, 2015). Para a montagem do vetor, os capsídeos virais são embalados com uma molécula de DNA transgênico de cadeia simples com cerca de 5 kb flanqueando com as repetições terminais virais invertidas (Figura 10) (ELLIS et al., 2013).

Apesar da alta especificidade na entrega à célula alvo, os AAVs possuem algumas limitações, sendo a principal o tamanho relativamente pequeno do genoma (~ 4,7 kb) e restringe um cassete de expressão a ~ 4,5 kb (LAFONTAINE; FATHE; SMYTH, 2015). Devido a isto, Os TALEs que são proteínas consideravelmente grandes (aproximadamente ~ 2,3 kb para um *array* repetitivo direcionado a 18 pb do DNA genômico), mais a inclusão do promotor, transgene e elementos de transcrição, aumenta o tamanho do TALE para, aproximadamente, 4,4 kb, quase o limite de um AAV. Neste caso, portanto, seria necessário dois AAV para a quebra da dupla fita de DNA (DENG; CARTER; FINK, 2019). No caso do sistema CRISPR-Cas9, este possui o tamanho de 4,2kb, onde o tamanho do AAV é limitante para empacotar todos seus componentes em um único vírus, uma vez que exigiria, adicionalmente, um promotor, uma sequência de poliadenilação e a sequência do gRNA (GUPTA; MUSUNURU, 2014). Uma solução alcançada para a limitação do tamanho do AAV foi a descoberta de uma enzima Cas9 da bactéria *Staphylococcus aureus* (SaCas9), que é 1 kb menor que a Cas9 de *Streptococcus pyogenes* e, portanto, mais facilmente embalada por um AAV. No caso do ZFN, felizmente, as sequências para expressar os monômeros da nuclease, têm cerca de 1 kb e, com um design cauteloso, é possível acomodar em um único vetor dois monômeros de ZFN juntamente com o modelo de DNA doador. Realizar, portanto, a entrega de todos os componentes em um único vetor resulta em maior especificidade e reduz os efeitos fora do alvo (LAFONTAINE; FATHE; SMYTH, 2015).

Figura 10 – Representação dos componentes para expressão do sistema CRISPR-Cas9 empacotado no vetor de transferência do gene AAV



ITR = repetição terminal invertida; CMV e U6 = promotor; gRNACREB e SaCas9-DIO = gene de interesse; pA= terminador.

Fonte: Modificado de (KUMAR et al., 2018)

4.8 Mecanismos de reparo do DNA

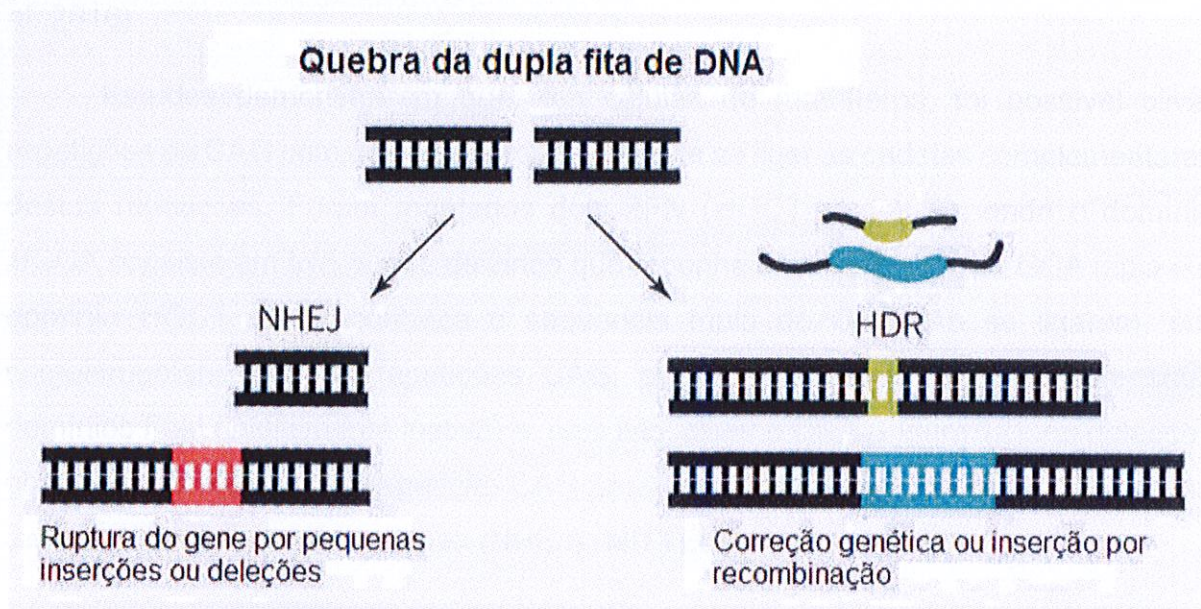
As vias de reparo são rapidamente ativadas após a quebra da dupla fita de DNA para que haja a manutenção da integridade genômica e, conseqüentemente, sobrevivência celular e funções da mesma preservadas (LEE et al., 2016). Estas quebras da dupla fita de DNA induzidas pelas nucleases podem ser reparadas por mecanismos como reparo dirigido por homologia (HDR) ou junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (DABROWSKA et al., 2018).

No mecanismo de reparo HDR há presença de uma sequência molde doadora, sendo essa sequência geralmente fornecida pela cromátide-irmã ou exogenamente por plasmídeos (LEE et al., 2016). Esta via de reparo permite inserir qualquer sequência de nucleotídeos no local onde foi realizada a clivagem para correção ou a introduzir certas mutações que permitem articular algumas doenças hereditárias (MALANKHANOVA et al., 2017). O NHEJ é um processo no qual as extremidades clivadas do DNA são diretamente ligadas por meio de proteínas de processamento

final (DNA ligase). É uma via de reparação propensa a erros, pois após a junção das extremidades, poderá ocorrer deleções de alguns nucleotídeos (LEE et al., 2016). Sendo assim, reparos direcionados por NHEJ podem ser utilizados para romper sequências do gene desejado, alterar o quadro de leitura, fazendo com que não haja síntese de uma proteína funcional (MALANKHANOVA et al., 2017).

Esses mecanismos de reparo do DNA podem ser explorados para reparação de uma mutação ou inativação de um gene. O do tipo HDR pode ser utilizado para inserção de uma sequência alvo específica, ou seja, com a introdução de um modelo de reparação que contém a mutação esperada flanqueada por braços homólogos. Já o mecanismo NHEJ pode ser utilizado para introduzir *frameshifts* (erros na matriz de leitura) na sequência codificante de um gene, fazendo com que haja perda de função, gerando, portanto, uma proteína truncada, proteína não funcional ou degradação do mRNA não funcional (este nem sempre é eficiente) (Figura 11) (NABAIS, 2015). Uma vantagem da inativação gênica por meio do NHEJ é a habilidade em atingir benefícios terapêuticos permanentes sem necessidade de tratamento contínuo (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Figura 11 – Mecanismos de reparo do DNA



Fonte: Modificado de (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014)

4.9 Edição do alelo HTT mutante

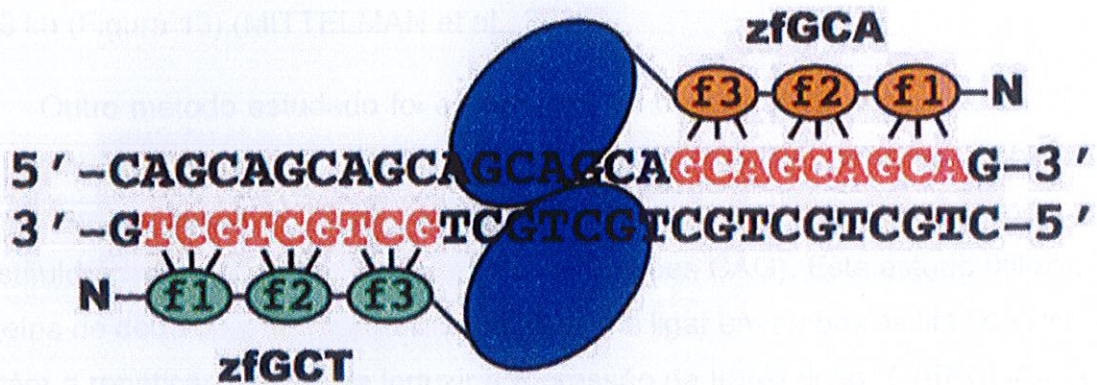
4.9.1 Edição utilizando Zinc Finger Nuclease

O ZFN direcionado às sequências repetitivas de CAG pode ser útil como terapia pois, após a clivagem, caso as sequências de CAG sejam reparadas por NHEJ, haverá deleção do número de nucleotídeos, logo, uma entrega específica de ZFN para células afetadas, poderia promover a redução do tamanho da repetição desses trinucleotídeos, aliviando portanto, os sintomas causados por essa repetição (MITTELMAN et al., 2009). Este direcionamento é importante pois, ao contrário de outros distúrbios como a doença de Parkinson e Alzheimer, a DH é monogênica. Logo, as estratégias terapêuticas ideais precisam visar somente a expressão do gene causal para que haja reversão dos efeitos da proteína mutante (GARRIGA-CANUT et al., 2012).

O sistema pode ser projetado para reprimir significativamente o alelo mutante em linhas de múltiplos fibroblastos derivados de pacientes com DH, bem como em neurônios diferenciados de células-tronco embrionárias que contém a expansão CAG no gene HTT (ZEITLER et al., 2014). Amplamente utilizado para geração de modelos animais, o ZFN é a única ferramenta de edição de genoma utilizada em ambientes clínicos, tendo os estudos para a DH em fase de desenvolvimento pré-clínico (LEE et al., 2016).

Estudos demonstraram que, em células de mamíferos, foi possível clivar repetições de CAG com domínios projetados para se ligar às cadeias complementares destas repetições. Foram montados dois ZFN (zfGCT e zfGCA), onde o domínio zfGCA consiste em três dedos de zinco que reconhece uma sequência GCA tripla e o domínio zfGCT que reconhece a sequência tripla de GCT. Ao se ligarem, por complementariedade às repetições CAG, permitiu a heterodimerização de seus domínios FokI (inicialmente inativa) e, com isto, clivar o DNA (Figura 12). As deleções observadas no trecho de repetição CAG possuem junções que são típicas de junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) (MITTELMAN et al., 2009).

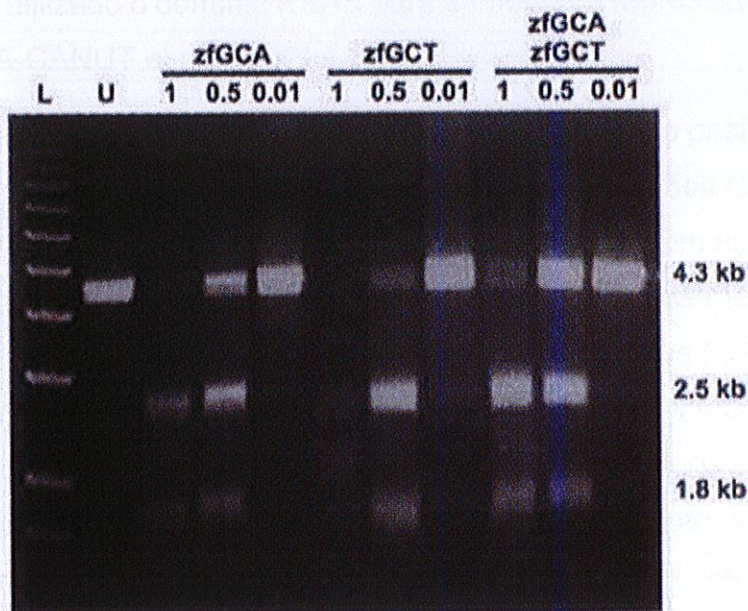
Figura 12 – Esquema de ligação no DNA por ZFNs específicos para CAG



Em vermelho é demonstrado o sítio de ligação, sendo as 9 cópias de CAG alvos para a nuclease FokI (ilustrado em azul).

Fonte: (MITTELMAN et al., 2009)

Figura 13 – Clivagem dos trechos de repetição CAG por ZFNs



Uma escala de 1kb (L) é representada na primeira faixa. A segunda faixa (U) é o vetor sem nucleases.

Fonte: Modificado de (MITTELMAN et al., 2009)

Quanto a capacidade de clivar a sequência de repetições CAG, as nucleases zfGCA e zfGCT foram testadas em conjunto e separadamente, em concentrações totais de 440 ng (1 x), 220 ng (0,5 x) ou 44 ng (0,01x) em 20 µL. As nucleases foram

incubadas com um vetor que tinha uma sequência de CAG com 38 repetições (4,3 kb). Foi observado, portanto, que a clivagem na repetição CAG gerou produtos de 2,5 e 1,8 kb (Figura 13) (MITTELMAN et al., 2009).

Outro método estudado foi a utilização do domínio KRAB em células ST *Hdh*, que são uma linhagem celular progenitora das células neuronais obtidas de camundongos knock-in (onde o primeiro exon do gene *HTT* de camundongo foi substituído por um exon humano com 111 repetições CAG). Este estudo utilizou uma proteína de dedo de zinco capaz de reconhecer e ligar em ambas as fitas de DNA que contém a repetição CAG para induzir a repressão da transcrição (GARRIGA-CANUT et al., 2012).

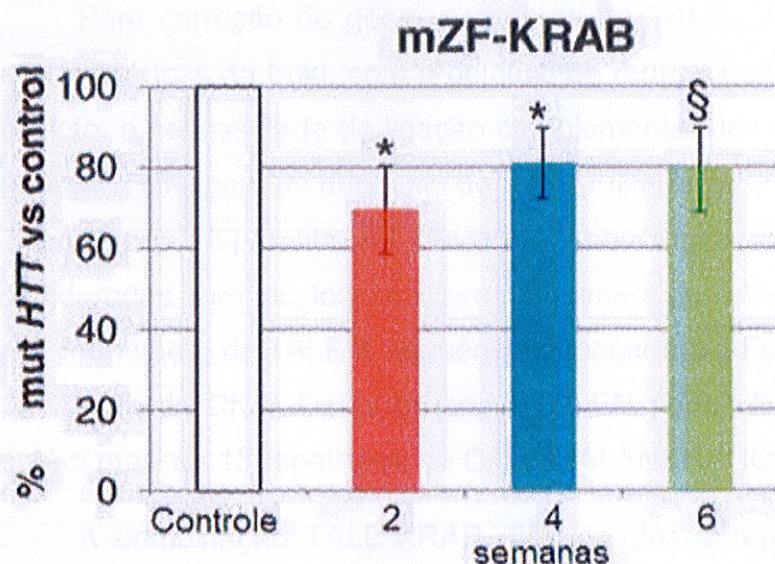
O domínio KRAB (caixa associada a Krüppel) está presente nas regiões amino-terminais de cerca de um terço dos dedos de zinco. Contém 75 aminoácidos, duas alfas hélices anfipáticas e é uma região altamente conservada (MARGOLIN et al., 1994). Neste caso como os alvos cromossômicos estão em uma quantidade muito menor, foi utilizado o domínio KRAB para aumentar a repressão por evento de ligação (GARRIGA-CANUT et al., 2012).

Observa-se que, neste sistema, existe uma relação positiva entre o número de repetições CAG e o nível de repressão, onde as repetições CAG são reprimidas de acordo com construções particulares de dedo de zinco, com ação em massa, ou seja, há uma preferência de comprimento, onde repetições CAG mais longas contém mais sítios de ligação e, portanto, são ligadas e mais reprimidas (GARRIGA-CANUT et al., 2012). Foi observado que uma redução de 30% no comprimento da sequência CAG reduziu cerca de 2 a 3 vezes a eficiência de clivagem nas células, levantando a hipótese que existe uma forte dependência de comprimento, sugerindo portanto, que as repetições extremamente longas que são típicas da DH, seriam os alvos preferidos para o ZFN (MITTELMAN et al., 2009).

Células contendo o *HTT* mutante que foram alvos do ZFN fundidos com domínio KRAB, tiveram redução de cerca de 80% da expressão do mRNA e 95% dos níveis de proteína mutante. Portanto, a construção de um ZFN mais longo e a utilização de um repressor transcricional como KRAB, demonstrou uma maior repressão cromossômica do *HTT* mutante (GARRIGA-CANUT et al., 2012).

Para avaliar a eficácia *in vivo*, foram utilizados camundongos R6/2 como modelos para DH, pois apresentam os sintomas iniciais precocemente, permitindo o uso de menos animais para o estudo (GARRIGA-CANUT et al., 2012). O ZFN alelo específico para a repressão do HTT mutante foi entregue ao estriado desses camundongos usando um AAV (ZEITLER et al., 2014).

Figura 14- Análise da expressão do gene huntingtina mutante após tratamento com ZFN



Fonte: Modificado de (AGUSTÍN-PAVÓN et al., 2016)

Por meio da técnica de PCR em tempo real, foi possível observar a repressão de aproximadamente 30% de HTT mutante em 2 semanas, estabilizando na margem de 20% na 4ª e 6ª semana (Figura 14). Assim, o ZFN demonstrou ser funcional na repressão do HTT mutante no período de 6 semanas, com sua toxicidade aparentemente reduzida, e os níveis de HTT normal não foram alteradas, tornando sua construção adequada para uso *in vivo* (AGUSTÍN-PAVÓN et al., 2016).

Com este resultado, a avaliação comportamental e motora mostrou-se positiva, onde houve melhora na coordenação motora e ausência de comportamento de *claspings*, demonstrando, portanto, que os dedos de zinco podem reprimir com sucesso, segurança e especificidade o HTT mutante *in vitro* e *in vivo* (MALANKHANOVA et al., 2017).

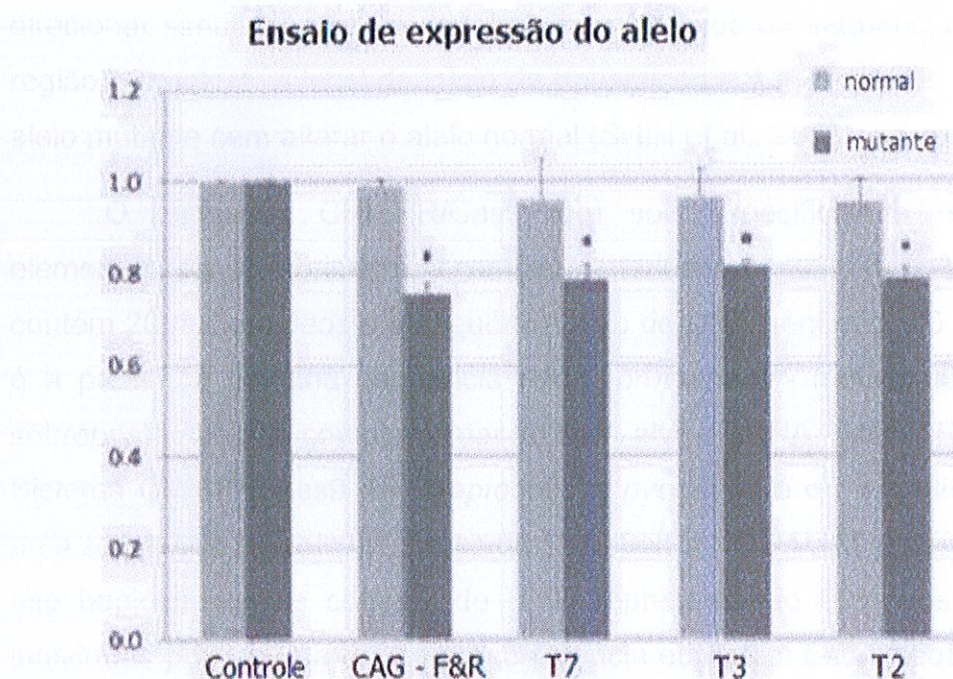
4.9.2 Edição utilizando TALEN

Para abordagem do silenciamento do alelo mutante por meio desta ferramenta biotecnológica, foram utilizados TALENs direcionados a SNPs que estão presentes na região promotora, próximos ao repressor de transcrição KRAB e ocorrem em 45% da população com DH, sendo: rs762855, rs3856973 e rs2024115. (FINK et al., 2016). A repressão do gene alvo ocorreu de forma direcionada, utilizando o domínio TALE fundido com um repressor de transcrição KRAB (MALANKHANOVA et al., 2017).

Para correção do gene, nos pares de TALEs, foram anexadas as variantes heterodiméricas da FokI, com o objetivo de reduzir os efeitos fora do alvo, havendo, portanto, a necessidade de ligação complementar dos dois arranjos de TALEN para que haja a clivagem da dupla fita de DNA (FINK et al., 2016). Para que não houvesse a quebra da dupla fita de DNA em sequências curtas de CAG, ou seja, as consideradas normais, foi considerada um número de CAG necessário para a ligação de cada monômero de TALEN, sequência espaçadora e FokI para ocorrer a dimerização e clivagem do DNA. Desta forma, o TALEN pode clivar somente sequências que contêm mais de 15 repetições de CAG (MALANKHANOVA et al., 2017).

A combinação TALE-KRAB direcionados a repetições CAG presentes nas sequências *forward* e *reverse* (CAG -F&R) e SNPs no alelo mutante rs762855, rs3856973 e rs2024115 demonstradas no gráfico como T7, T3 e T2 respectivamente, em uma população mista de fibroblastos tratados e não tratados, utilizando um ensaio de genotipagem, não evidenciou diferenças significativas entre os grupos de expressão do alelo normal, no entanto, demonstrou a redução de até 20% da expressão do alelo mutante (Figura 15) (FINK et al., 2016). Esta combinação mostrou-se capaz de se ligar e regular a expressão gênica, indicando especificidade para o alelo mutante, uma vez que a expressão do alelo normal estava inalterada. (MALANKHANOVA et al., 2017).

Figura 15 – Expressão do alelo mutante após a utilização do TALEN



Fonte: Modificado de (FINK et al., 2016)

Para a correção do gene por meio do colapso de CAG, foi revelada diferenças significativas entre a expressão do alelo normal e alelo mutante, sugerindo que o TALE não tem como alvo o alelo saudável (FINK et al., 2016). Portanto, utilizando a combinação TALE-KRAB e TALE com variantes da FokI, houve a diminuição significativa na agregação de proteínas no núcleo da célula e na expressão de HTT mutante nos fibroblastos provenientes de pacientes com a DH (MALANKHANOVA et al., 2017).

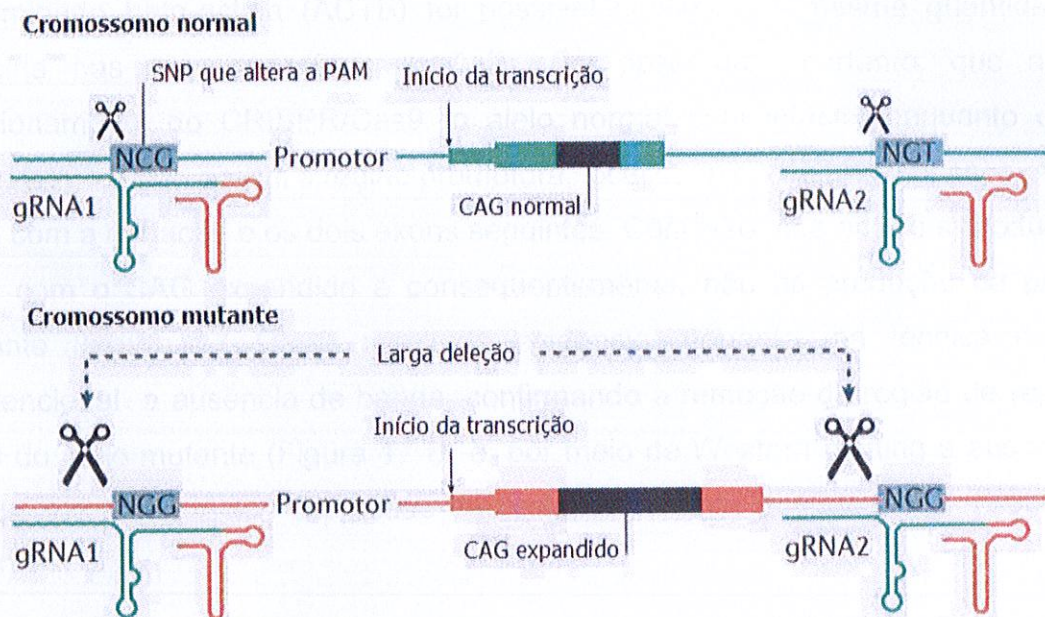
4.9.3 Edição utilizando CRISPR/Cas9

Foram identificados pares de sequências PAM que estão presentes no alelo mutante, mas ausentes no alelo normal. Uma possível abordagem é o direcionamento específico do alelo mutante para eliminar a produção da proteína huntingtina tóxica, este por meio de polimorfismos que distinguem os haplótipos comuns na DH e populações normais, obtendo então, seletividade para inativação do alelo mutante (SHIN et al., 2016). Na DH, a poliglutamina se repete dentro do exon-1 do gene HTT. Logo, a edição genética do alelo específico pode ser alcançada aproveitando os SNPs

prevalentes que eliminam a sequência PAM (MONTEYS et al., 2017). Estudos demonstram a estratégia de utilizar o sistema CRISPR/Cas9 personalizado para direcionar simultaneamente dois locais específicos da sequência PAM e eliminar a região promotora, o local de início da transcrição e a mutação de expansão CAG do alelo mutante sem alterar o alelo normal (SHIN et al., 2016).

O complexo CRISPR/Cas9 tem sua especificidade regulada por dois elementos, sendo o primeiro, a complementariedade entre a sequência do gRNA, que contém 20 nucleotídeos e a sequência alvo de DNA genômico. O segundo elemento é a presença de uma sequência PAM (*protospacer*- motivo adjacente) que está sobreposta à região complementar do DNA alvo e gRNA. (MONTEYS et al., 2017). O Sistema CRISPR Cas9 de *Streptococcus pyogenes* é o mais utilizado, este possui uma sequência NGG PAM. Cerca de 1003 SNPs NGG PAM estão presentes entre os oito haplótipos mais comuns do HTT, representando 90% dos cromossomos de indivíduos portador da DH com ascendência europeia. Estas sequências NGG PAM polimórficas estão distribuídas no gene HTT de forma específica do haplótipo, com um alelo CAG expandido em hap.01 e um alelo CAG normal em hap.08. O alvo, portanto, é o NGG PAM específico do hap.01 (SHIN et al., 2016). Isso faz com que haja exclusão do alelo HTT mutante usando PAM dependente de SNP flanqueando o exon-1 do HTT que, quando está em heterozigose, ligaria a proteína Cas9 ao mutante, mas não ao alelo normal (MONTEYS et al., 2017). Os SNPs que são capazes de alterar a sequência PAM fornecem a estratégia para o sistema CRISPR alcançar a especificidade alélica perfeita. A sequência NGG é a preferida, enquanto NCG e NGT não levam à clivagem do DNA (Figura 16) (MALKKI, 2016).

Figura 16 – SNP que altera a sequência PAM



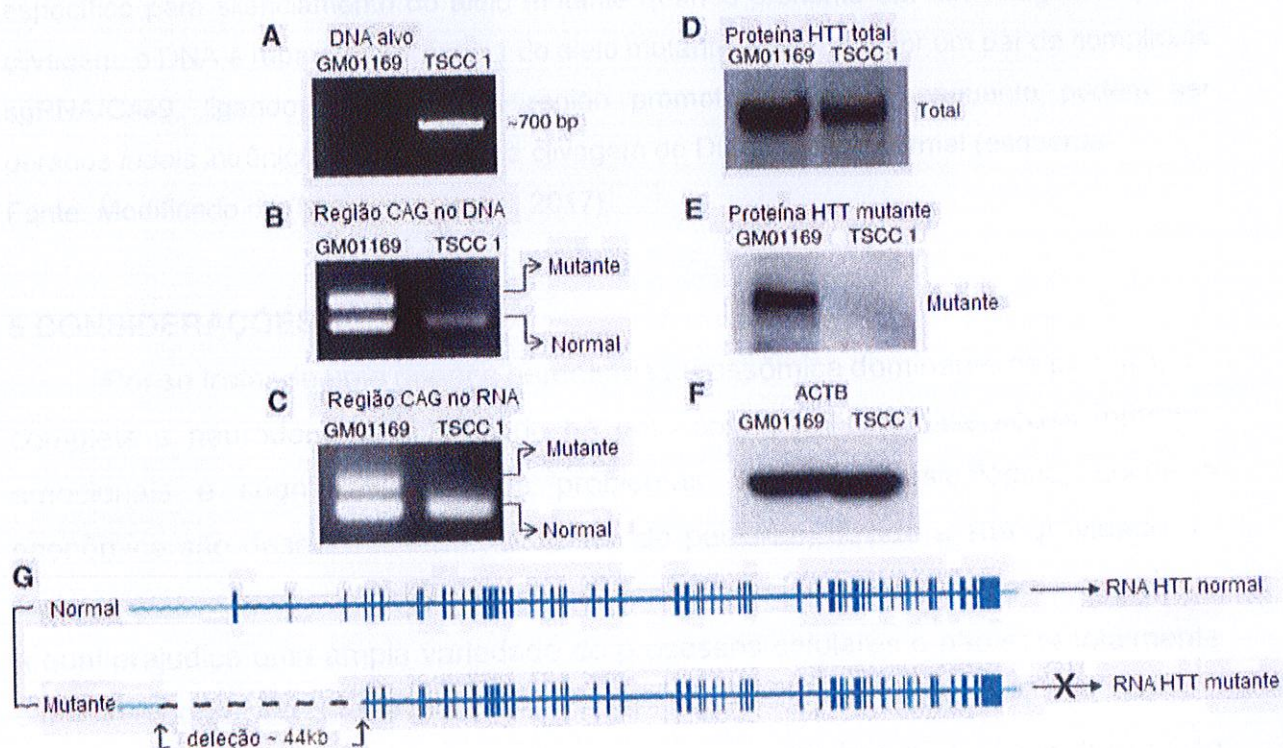
gRNA, RNA guia; PAM, *protospacer*-motivo adjacente; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

Fonte: Modificado de (MALKKI, 2016)

Utilizando fibroblastos humanos provenientes de pacientes com DH, foi realizada a edição específica do alelo mutante usando a estratégia de PAM dependente de SNP na região do promotor HTT (MONTEYS et al., 2017). Foi realizada a transfecção das células dos pacientes com dois vetores CRISPR/Cas9 diferentes que expressam dois gRNAs. Para demonstrar os resultados da clivagem específica do alelo mutante utilizando CRISPR/Cas9, foi utilizado um clone único de célula alvo (TSCC) e, como amostra referência, foram usadas células não tratadas denominadas GM01169. Uma análise por meio da técnica de PCR, foi feita a confirmação da deleção de aproximadamente 44kb de DNA no TSCC1 e para verificar se a região removida trata-se da repetição CAG do alelo mutante, foi analisado o DNA das células não tratadas e o clone alvo (Figura 17 A; Figura 17 B). Após a remoção da região CAG expandida, para confirmar a ausência de RNA com esta repetição, foi realizado uma análise por RT-PCR (Figura 17 C). Os níveis totais de proteína huntingtina (normal e mutante) foram determinados por análise de Western blotting utilizando um anticorpo anti-huntingtina (MAB 2166) nas células não tratadas e no clone alvo (Figura 17 D). Sendo que, a análise de transferência de Western foi realizada utilizando anticorpo específico de huntingtina mutante (1F8) para determinar

os níveis de expressão da proteína mutante (Figura 17 E). Utilizando outro anticorpo, denominado beta-actina (ACTB) foi possível confirmar a mesma quantidade de proteína nas amostras (Figura 17 F). Foi observado, portanto, que após o direcionamento do CRISPR/Cas9, o alelo normal está intacto, enquanto o alelo mutado agora não possui a região promotora, local de início da transcrição, o primeiro exon com a mutação e os dois exons seguintes. Com isso, não ocorre a produção de RNA com o CAG expandido e consequentemente, não há produção da proteína mutante (Figura 17 G) O resultado evidencia, portanto, na técnica de PCR convencional a ausência de banda, confirmando a remoção da região de repetição CAG do alelo mutante (Figura 17 B) e, por meio de Western blotting a ausência de banda, indicando a não expressão da proteína mutante (Figura 17 E) (SHIN et al., 2016).

Figura 17 – Resultados do direcionamento de duplo gRNA específicos para o alelo mutante mediado por CRISPR/Cas9

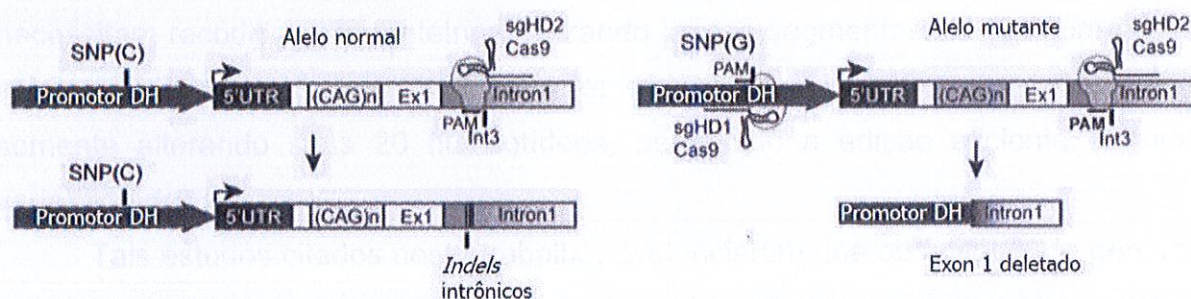


Fonte: Modificado de (SHIN et al., 2016)

A edição do HTT mutante *in vivo* pode ser feita utilizando camundongos BACHD, que são transgênicos para o alelo HTT humano. Para isto, foram gerados AAV recombinantes expressando a Cas9 e gRNA que serão responsáveis pela

exclusão do exon 1 do HTT humano *in vitro*. Posteriormente, esses camundongos tiveram seu hemisfério direito transfectados com esses AAVs e o hemisfério esquerdo não foi injetado, sendo utilizado como controle (MONTEYS et al., 2017). O resultado observado nos camundongos foi depleção dos agregados de huntingtina no cérebro, atenuação da doença e melhora da função motora (WILD; TABRIZI, 2017).

Figura 18- Imagem representando uma estratégia de edição alelo específica para anular expressão do HTT mutante



Os SNPs presentes nas sequências PAM no exon 1 do HTT permite o direcionamento específico para silenciamento do alelo mutante quando presente em heterozigose. Após a clivagem, o DNA é reparado e o exon 1 do alelo mutante é deletado por um par de complexos sgRNA/Cas9, ligando o intron 1 a região promotora (direita), enquanto podem ser gerados *indels* intrônicos por uma única clivagem do DNA no alelo normal (esquerda).

Fonte: Modificado de (MONTEYS et al., 2017)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de uma doença hereditária autossômica dominante de penetrância completa e neurodegenerativa, onde há uma combinação de alterações motoras, emocionais e cognitivas, diversos problemas de ordem psicológica, social e econômica são desencadeados na família do paciente, devido a sua gravidade. E, embora seja uma doença monogênica, sua fisiopatologia é extremamente complexa, a qual prejudica uma ampla variedade de processos celulares e não está totalmente elucidada, tornando um grande desafio para o desenvolvimento de novas terapias.

As terapias farmacológicas existentes, apesar da boa resposta a diminuição dos sintomas, não impedem a progressão da doença e acarretam no aparecimento de muitos eventos adversos. Com isso, uma terapia direcionada ao alvo que é o HTT mutante seria uma boa maneira de inativar, permanentemente, a produção da proteína tóxica e, conseqüentemente, interromper a progressão da doença.

Em relação aos editores genômicos, foi observado que as nucleases possuem algumas limitações nos aspectos como tamanho, eficiência e simplicidade no design. Quando se trata do tamanho, o ZFN mostrou-se mais eficiente na entrega por AAV, por ser menor em relação aos editores TALEN e CRISPR/Cas9. Entretanto, o reconhecimento das bases nitrogenadas realizado pelo ZFN é feito por tripletes, ao contrário do TALEN que é de maneira individual, diminuindo, portanto, as sequências de DNA que podem ser alvos desse editor. Já o sistema CRISPR/Cas9 é uma ferramenta facilmente manipulável, pois, contrariamente ao ZFN e TALEN que necessitam recodificar as proteínas utilizando longos segmentos de DNA para cada alvo escolhido, o CRISPR/Cas9 pode ter seu gRNA adaptado para o novo alvo somente alterando seus 20 nucleotídeos, permitindo a edição eficiente de uma variedade de células.

Tais estudos citados neste trabalho, evidenciaram que os editores de genoma são ferramentas interessantes devido a capacidade de alterar o gene responsável pelo desenvolvimento da doença. Na comparação entre os três editores abordados, o ZFN e o sistema CRISPR/cas9 demonstraram-se superiores: o ZFN por ser altamente específico em longas repetições de CAG e, na adição do repressor KRAB, demonstrou maior eficiência na edição *in vitro* em comparação ao TALEN. Já o sistema CRISPR/cas9 devido a capacidade de direcionar gRNAs para locais PAM que contém SNPs característicos dos haplótipos da DH, resultando em depleção dos agregados de huntingtina no cérebro e melhora da função motora dos camundongos testados.

Contudo, apesar da alta especificidade apresentada pelo sistema CRISPR, a proteína Cas9 é de origem bacteriana e, se uma resposta imune, porventura, fosse desencadeada no cérebro humano, as células que foram editadas seriam eliminadas, anulando as consequências positivas da remoção do alelo mutante. Portanto, é necessário haver uma grande dedicação para que a Cas9 seja expressa de forma transitória.

Em relação a edição do gene HTT, é desejável, preferencialmente, direcionar ao alelo mutante e também não afetar outros genes que contém a repetição CAG, pois acredita-se que a função da huntingtina normal seja essencial para o desenvolvimento e manutenção de neurônios maduros, entretanto, apenas uma cópia do gene é o suficiente para o desenvolvimento e viabilidade normais.

REFERÊNCIAS

AGUSTÍN-PAVÓN, Carmen et al. Deimmunization for gene therapy: host matching of synthetic zinc finger constructs enables long-term mutant Huntingtin repression in mice. **Molecular Neurodegeneration**, [S.l.], v. 11, n. 1, p.1-16, Sept. 2016. Available from: <<https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-016-0128-x>>. Access on: 16 feb. 2019.

APOLINÁRIO, Thays Andrade et al. Comparação de técnicas utilizadas para a realização de diagnóstico da doença de huntington. In: 65ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 65., 2013, Recife. **Comparação de técnicas utilizadas para a realização de diagnóstico da doença de huntington**. Recife: sbpc, 2013. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/3067.htm>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

ASCARI, Lucimara; GHISI, Nédia de Castilhos. Estudo da doença de huntington (HD) em uma família do sudoeste do Paraná. In: III Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR- DV, 3., 2015, Dois Vizinhos. **Estudo da doença de huntington (HD) em uma família do sudoeste do paraná**. Dois Vizinhos: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015. p. 253 - 255. Disponível em: <http://revistas.utfpr.edu.br/dv/index.php/CCT_DV/article/viewFile/1378/809>. Acesso em: 31 jan. 2019.

BAILUS, Barbara; ZHANG, Ningzhe; ELLERBY, Lisa M. Using Genome Engineering to Understand Huntington's Disease. **Research and Perspectives in Neurosciences**, [S.l.], p.87-101, Sept. 2017. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/319854565_Using_Genome_Engineering_to_Understand_Huntington's_Disease>. Access on: 05 Feb. 2019.

BAKER, Monya. Gene-editing nucleases. **Nature Methods**, [S.l.], v. 9, n. 1, p.23-26, Jan. 2012. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.1807>>. Access on: 21 Feb 2019.

BIBIKOVA, M. et al. Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases. **Molecular and Cellular Biology**, [S.l.], v. 21, n. 1, p.289-297, 1 Jan. 2001. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88802/>>. Access on: 25 Mar. 2019.

CARROLL, Dana. Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases. **Genetics**, [S.l.], v. 188, n. 4, p.773-782, Aug. 2011. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176093/>>. Access on: 10 Feb. 2019.

CATTANEO, Elena; ZUCCATO, Chiara; TARTARI, Marzia. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.l.], v. 6, n. 12, p.919-930, 15 Nov. 2005. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nrn1806>>. Access on: 04 Jan. 2019.

CHEMALE, Fernando Andersson et al. **Doença de Huntington**. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 2000. 37 f. Disponível em: <<http://www.luzimarteixeira.com.br/wp-content/uploads/2010/07/doenca-de-huntington-2.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

COX, David Benjamin Turitz; PLATT, Randall Jeffrey; ZHANG, Feng. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. **Nature**, [S.l.], v. 21, n. 2, p.121-131, Feb. 2015. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nm.3793>>. Access on: 15 Feb. 2019.

DABROWSKA, Magdalena et al. Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases. **Frontiers in Neuroscience**. [S.l.], p. 1-8. Feb. 2018. Available from: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00075/full>>. Access on: 15 Nov. 2018.

DENG, Peter; CARTER, Sakereh; FINK, Kyle. Design, Construction, and Application of Transcription Activation-Like Effectors. In: MANFREDSSON, Fredric P.; BENSKEY, Matthew J. **Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols**. New York: Springer Nature, 2019. Cap. 3. p. 47-58. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30706389>>. Access on: 24 Mar. 2019.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [S.l.], v. 346, n. 6213, p.1077- 1087, Nov. 2014. Available from: <<http://science.sciencemag.org/content/346/6213/1258096>>. Access on: 20 Nov. 2018.

ELLIS, B L et al. Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs. **Gene Therapy**, [S.l.], v. 20, n. 1, p.35-42, Jan. 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257934>>. Access on: 25 Mar. 2019.

FERNÁNDEZ, Almudena; JOSA, Santiago; MONTOLIU, Lluís. A history of genome editing in mammals. **Mammalian Genome**, [S.l.], v. 28, n. 7-8, p.237-246, Jun. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28589393>>. Access on: 25 Mar. 2019.

FINK, Kyle D. et al. Allele-Specific Reduction of the Mutant Huntingtin Allele Using Transcription Activator-Like Effectors in Human Huntington's Disease Fibroblasts. **Cell Transplantation**, [S.l.], v. 25, n. 4, p.677-686, Apr. 2016. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.3727/096368916X690863?url_ver=Z39.882-003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed>. Access on: 26 Feb. 2019.

GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS, Carlos F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, [S.l.], v. 31, n. 7, p.397-405, Jul. 2013. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3694601/>>. Access on: 15 Feb. 2019.

GARRIGA-CANUT, M. et al. Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 109, n. 45, p.3136-3145, Oct. 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3494930/>>. Access on: 26 Feb. 2019.

GEURTS, Aron M. et al. Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. **Science**, [S.l.], v. 325, n. 5939, p.433-433, Jul. 2009. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831805/pdf/nihms171136.pdf>>. Access on: 24 Mar. 2019.

GIL-MOHAPEL, Joana M; REGO, Ana Cristina. Doença de Huntington: Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos. **Revista Neurociências**, Coimbra, v. 4, n. 19, p.724-734, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.revistaneurociencias.com.br/edicoes/2011/RN1904/revisao%2019%2004/595%20revisao.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

GLORIOSO, J. C et al. Moving toward a gene therapy for Huntington's disease. **Gene Therapy**. [S.l.], p. 931-933. Dec. 2015. Available from: <<https://www.nature.com/articles/gt2015102>>. Access on: 24 Jan. 2019.

GONÇALVES, Nuno Filipe de Carvalho. **Doença de Huntington: uma revisão**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina), Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013. Disponível em: <<https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/1410/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Huntington%20Nuno%20Gon%C3%A7alves.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2018.

GUPTA, Rajat M.; MUSUNURU, Kiran. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. **Journal of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 124, n. 10, p.4154-4161, Oct. 2014. Available

from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4191047/>>. Access on: 24 Mar. 2019.

HSU, Patrick d.; LANDER, Eric s.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, [S.I.], v. 157, n. 6, p.1262-1278, Jun. 2014. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/>>. Access on: 18 Jan. 2019.

ISALAN, Mark. Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. **Nature Methods**, Barcelona, v. 9, n. 1, p.32-34, jan. 2012. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.1805>>. Access on: 21 Feb. 2019.

ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. **Journal Of Bacteriology**. [S.I.], v.200, n. 7, p. 1-17. Apr. 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5847661/>>. Access on: 15 Nov. 2018.

JAMA, Mohamed et al. Triplet Repeat Primed PCR Simplifies Testing for Huntington Disease. **The Journal of Molecular Diagnostics**, [S.I.], v. 15, n. 2, p.255-262, Mar. 2013. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S152515781200308X>>. Access on: 20 Nov. 2018.

KANDAVELOU, Karthikeyan et al. Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.I.], v. 388, n. 1, p.56-61, Oct. 2009. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744961/>>. Access on: 26 Feb. 2019.

KIM, Yang-gyun; CHA, Jooyeun; CHANDRASEGARAN, Srinivasan. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Journal of Biochemistry**. Baltimore, p. 1156-1160. Feb. 1996. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40048/pdf/pnas01507-0203.pdf>>. Access on: 24 Mar. 2019.

KOLLI, Nivya et al. Application of the gene editing tool, CRISPR-Cas9, for treating neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, [S.I.], v. 112, p.187-196, Jan. 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28732771>>. Access on: 01 Feb. 2019.

KOLLI, Nivya et al. CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 18, n. 4, p.1-14, Apr. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5412339/>>. Access on: 10 Nov. 2018.

KUMAR, Namrata et al. The Development of an AAV-Based CRISPR SaCas9 Genome Editing System That Can Be Delivered to Neurons in vivo and Regulated via Doxycycline and Cre-Recombinase. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S.I.], v. 11, n. 413, p.1-14, Nov. 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6243075/>>. Access on: 24 Mar. 2019.

LANDER, Eric s. The Heroes of CRISPR. **Cell**, [S.I.], v. 164, n. 1-2, p.18-28, Jan. 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415017055#bib35>>. Access on: 15 Nov. 2018.

LEE, Han B. et al. Genome Engineering with TALE and CRISPR Systems in Neuroscience. **Frontiers in Genetics**, [S.I.], v. 7, n. 47, p.1-24, Apr. 2016. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821859/>>. Access on: 25 Feb. 2019.

MALANKHANOVA, Tuyana B. et al. Modern Genome Editing Technologies in Huntington's Disease Research. **Journal of Huntington's Disease**, [S.I.], v. 6, n. 1, p.19-31, 28 Mar. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389024/>>. Access on: 02 Feb. 2019.

MALKKI, Hemi. Selective deactivation of Huntington disease mutant allele by CRISPR-Cas9 gene editing. **Nature Reviews Neurology**, [S.I.], v. 12, n. 11, p.614-615, 30 Sept. 2016. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nrneurol.2016.151#article-info>>. Access on: 30 Sept. 2018.

MARGOLIN, J F et al. Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 91, n. 10, p.4509-4513, May. 1994. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43815/>>. Access on: 28 Feb. 2019.

MARGOLIS, Russell L.; ROSS, Christopher A. Diagnosis of Huntington Disease. **Clinical Chemistry**. Baltimore, v. 49, n. 10, p. 1726-1732. Sept. 2003. Available from: <<http://clinchem.aaccjnls.org/content/49/10/1726.full>>. Access on: 04 Jan. 2019.

MARTELLI, Anderson. Aspectos clínicos e fisiopatológicos da Doença de Huntington. **Archives of Health Investigation**, São Paulo, v. 4, n. 3, p.32-39, Ago. 2014. Disponível em: <<http://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/687>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

MCCOLGAN, Peter; TABRIZI, Sarah J. Huntington's disease: a clinical review. **European Journal of Neurology**. Londres, p. 24-34. Aug. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28817209>>. Access on:16 Mar. 2018.

MIGUEL, Samira Castro Pires et al. Efeitos positivos e negativos da indicação terapêutica farmacológica em pacientes com doença de Huntington. **Revista Científica da Faminas**, Muriaé, v. 8, n. 2, p.47-65, jan. 2012. Disponível em: <<http://periodicos.faminas.edu.br/index.php/RCFaminas/article/view/296/272>>. Acesso em: 27 mai. 2018.

MILLER, Jeffrey C et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. **Nature Biotechnology**, [S.l.], v. 29, n. 2, p.143-148, Dec. 2010. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nbt.1755#author-information>>. Access on:26 Feb. 2019.

MITTELMAN, D. et al. Zinc-finger directed double-strand breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.I.], v. 106, n. 24, p.9607-9612, May 2009. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701052/>>. Access on: 26 Feb. 2019.

MONTEYS, Alex Mas et al. CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele in Vitro and In Vivo. **Molecular Therapy**, [S.I.], v. 25, n. 1, p.12-23, Jan. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129107>>. Access on: 10 Nov. 2019.

NABAIS, Ana Teresa Gaspar. **Técnicas de edição de genoma como abordagem promissora na terapia gênica**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado Curso de Ciências Farmacêuticas), Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, 2015. Disponível em: <<https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/10973/1/Nabais%2c%20Ana%20Teresa%20Gaspar.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

NEMUDRYI, A. A. et al. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. **Acta Naturae**. [S.I.], p. 19-40. Jul. 2014. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4207558/>>. Access on: 25 Mar. 2019.

OLIVEIRA, Bárbara de Alencar et al. Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, Belém, v. 9, n. 2, p.55-64, set. 2018. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v9n2/2176-6223-rpas-9-02-57.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

OVERVIEW, GENBANK. **HTT huntingtin [Homo sapiens (human)]**. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>>. Acesso em: 04 jan. 2019.

PAVÓN-REALPE, Victor H. et al. Estado de la mutación del gen IT-15 (HTT) en familias ecuatorianas con enfermedad de Huntington. **Archivos de Neurociencias**, [S.l.], v. 19, n. 2, p.73-78, jun. 2014. Disponible en: <<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=52411>>. acceso en: 07 marzo. 2019.

PEREIRA, Lorraine Poltronieri. **Estudo molecular da Doença de Huntington e correlações com as manifestações clínicas**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado Curso de Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.ufes.br/bitstream/10/1974/1/dissertacao%20Lorraine%20Poltronieri.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

RAMOS, António David Rufino. **CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. 2016. 31 f. Dissertação (Mestrado Curso de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016. Disponível em: <<https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/42065/1/MONO-DAVID.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

RICHTER, Corinna; CHANG, James T.; FINERAN, Peter C. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. **Viruses**. Dunedin, p. 2291-2311. Oct. 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497052/>>. Access on: 20 Jan. 2019.

SAUDOU, Frederic; HUMBERT, Sandrine. The Biology of Huntingtin. **Cell**, [S.l.], v. 89, n. 5, p.910-926, Mar. 2016. Available from: <[https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(16\)00096-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627316000969%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(16)00096-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627316000969%3Fshowall%3Dtrue)>. Access on: 20 Jan. 2019.

SHIN, Jun Wan; LEE, Jong-min. The prospects of CRISPR-based genome engineering in the treatment of neurodegenerative disorders. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, [S.l.], v. 11, p.1-11, Nov. 2017. Available from:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5784517/#>>. Access on: 10 Nov. 2018.

SHIN, Jun Wan et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. **Human Molecular Genetics**, [S.l.], v. 25, n. 20, p.4566-4576, 15 Sept. 2016. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28172889>>. Access on: 30 Sept. 2018.

SILVA, Iane dos Santos da; AGOSTINHO, Luciana de Andrade; PAIVA, Carmen Lúcia Antão. Comparação entre eletroforese em gel de agarose e capilar automatizada na detecção de amplificação das repetições CAG no gene htt. **Cesumar**, Maringá, v. 15, n. 2, p.139-146, dez. 2013.

SOUZA, Gustavo Torres de. **Produção de células MDBK expressando a enzima Cas9 e edição do gene Beta-Lactoglobulina pelo sistema CRISPR/Cas9**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado Curso de Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/6049/1/gustavotorresdesouza.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SPITZ, Mariana. DOENÇA DE HUNTINGTON E OUTRAS COREIAS. **Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p.29-38, jun. 2010. Disponível em: <http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=148>. Acesso em: 15 mar. 2019.

WALTER, Juliane; GRAVE, Magali T. Q.; PÉRICO, Eduardo. Avaliação das habilidades psicomotoras e da motricidade global em paciente portadora da Doença de Huntington. **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v. 8, n. 4, p.655-663, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/929/92912706017/>>. Acesso em: 01 abr. 2018.

WILD, Edward J; TABRIZI, Sarah J. Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. **The Lancet Neurology**, [S.l.], v. 16, n. 10, p.837-847, Oct. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5604739/>>. Access on: 28 Feb. 2019.

WIRTH, Thomas; PARKER, Nigel; YLÄ-HERTTUALA, Seppo. History of gene therapy. **Gene**, [S.l.], v. 525, n. 2, p.162-169, Aug. 2013. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111913004344?via%3Dihub>>. Access on: 21 Feb. 2019.

WRIGHT, David a. et al. TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. **Biochemical Journal**, [S.l.], v. 462, n. 1, p.15-24, 15 Aug. 2014. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057889>>. Access: 26 Feb. 2019.

XIMENES, Bruna Antunes de Aguiar; TEIXEIRA, Eduardo Henrique. Doença de Huntington: aspectos diagnósticos e implicações éticas. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 18, n. 6, p.287-291, dez. 2009. Disponível em: <<https://seer.sis.puccampinas.edu.br/seer/index.php/cienciasmedicas/article/view/628>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

YANG, Su et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. **The Journal of Clinical Investigation**. Atlanta, p. 2719-2724. May. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490741/>>. Access on: 25 Feb. 2018.

ZEITLER, Bryan et al. Allele-Specific Repression of Mutant Huntingtin Expression by Engineered Zinc Finger Transcriptional Repressors as a Potential Therapy for Huntington's Disease. **Molecular Therapy**, Los Angeles, v. 22, n. 1, p.233-233, May. 2014. Available from: <[https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(16\)35616-7](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(16)35616-7)>. Access on: 26 Feb. 2019.