

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Curso de Biomedicina**

**Paulo Augusto Souza Rocha da Silva**

**TERAPIA GÊNICA DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS POR  
MEIO DE *Cas* NUCLEASES : UMA REVISÃO ACIMA DO CENÁRIO  
ATUAL**

**São Paulo**

**2019**

**Paulo Augusto Souza Rocha da Silva - RA: SPGR005896**

**TERAPIA GÊNICA DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS POR  
MEIO DE NUCLEASES ASSOCIADAS A *CRISPR*: APLICAÇÕES E  
POSSIBILIDADES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela profa. Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2019**

**Paulo Augusto Souza Rocha da Silva**

**TERAPIA GÊNICA DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS POR MEIO DE  
NUCLEASES ASSOCIADAS A *CRISPR*: APLICAÇÕES E POSSIBILIDADES**

**São Paulo, 21 de Novembro de 2019**

---

**Orientadora: Profa. Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza**

---

**Examinador: Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima**

**São Paulo  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani**

Silva, Paulo Augusto Souza Rocha da  
Terapia gênica de doenças neurodegenerativas por meio de Cas nucleases : uma revisão acima do cenário atual / Paulo Augusto Souza Rocha da Silva. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.  
55 p.

Orientação de Marjorie Mendes Marini e Souza.

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

1. Doença de Alzheimer 2. Doença de Huntington 3. Doenças neurodegenerativas 4. Sistemas CRISPR-Cas 5. Terapia genética I. Souza, Marjorie Mendes Marini e II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 575.1

## RESUMO

As doenças neurodegenerativas representam alto impacto de saúde aos acometidos, tendo em vista serem doenças inevitavelmente progressivas e incuráveis. Por não existirem métodos terapêuticos eficazes para tais doenças, faz-se necessário o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas. As técnicas desenvolvidas em torno de terapia gênica, como a técnica de *CRISPR-Cas9*, atuam editando fragmentos gênicos que podem estar envolvidos com o processo patológico destas doenças. Apesar de sua alta especificidade, a técnica ainda está em desenvolvimento, em particular no que se diz respeito a sua aplicação em doenças neurodegenerativas. O objetivo geral desta revisão é de analisar pesquisas que utilizem do sistema para edição gênica *CRISPR-Cas* em modelos da Doença de Huntington (DH) e da Doença de Alzheimer (DA), focando em suas metodologias e resultados e comparando-os quando relevante. Foram artigos científicos provenientes de bases de dados, além de livros didáticos relevantes ao tema. Foram analisados, no total, 10 artigos. 6 (seis) destes artigos visam alternativas terapêuticas para DH em modelos murinos e células provenientes de indivíduos afetados, enquanto que os outros 4 (quatro) estudam a aplicabilidade da técnica em modelos da DA. É perceptível uma divergência, em relação a pesquisa aplicada a DA e DH, onde o foco é otimizar a técnica aplicada em um único alvo gênico, na DH e no caso da DA, o foco é encontrar um alvo gênico eficiente para reverter o perfil fenotípico dos modelos editados. A metodologia diverge em todos os artigos em maior ou menor grau. A variação das metodologias é menor no Caso da DA e maior, no caso da DH. Notavelmente, a maioria dos trabalhos em DH focaram em haplótipos da doença que ocorrem de forma heterozigota, permitindo a edição gênica apenas no alelo mutante e, além disso, promoveram edições com diferentes variantes da enzima Cas. No caso da DA, os métodos de edição não foram variados, mas os alvos gênicos, sim. O uso da técnica de *CRISPR-Cas* para reverter o processo patológico da DA e da DH ainda é pouco estudado e, por isso, as técnicas ainda são empregadas de forma não-otimizada ou não-viável para a prática clínica. Apesar disso, estudos recentes demonstram resultados promissores em relação as taxas de sucesso de excisão, reversão da neurotoxicidade e recuperação de fenótipos saudáveis em modelos *in vitro* e *in vivo*, dando ao cenário atual uma boa perspectiva futura.

**Palavras-chave:** Doenças neurodegenerativas; Doença de Alzheimer; Doença de Huntington; Terapia gênica; *CRISPR/Cas9*.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases have a high health impact on those affected, as they are inevitably progressive and incurable diseases. As there are no effective therapeutic methods for such diseases, more therapeutic procedures need to be developed. Gene therapy emerge as potential to treat neurodegenerative diseases, and the CRISPR-Cas9 has stood among the others. This technique acts by editing gene fragments that may be involved with the pathological processes of such diseases. Despite its high specificity, the technique is still under development, particularly as regards its application in neurodegenerative diseases. The aim of this review is to analyze the use of CRISPR-Cas gene editing system in Huntington's disease (DH) and Alzheimer's disease (AD), mainly comparing the methodologies and results. Scientific articles from databases, as well as textbooks relevant to the theme were used. A total of 10 articles were analyzed. 6 (six) of these articles aim at therapeutic alternatives for HD in murine models and cells from affected individuals, while the other 4 (four) study the applicability of the technique in AD models. It is noticeable a divergence from research applied to AD and HD. In HD the focus is to optimize the technique applied to a single gene target. In AD the emphasis is find an efficient gene target to reverse the phenotypic profile. The methodology differs in all articles to a greater or lesser extent. The variation of methodologies is smaller in the case of AD and greater in the case of HD. Notably, most studies in HD have focused on heterozygous haplotypes of the disease, allowing gene editing only in the mutant allele and, in addition, promoting editions with different variants of the Cas enzyme. In the case of AD, the editing methods were not varied, but the gene targets were. The use of CRISPR-Cas technique to reverse the pathological process of AD and HD is still poorly studied and, therefore, the techniques are still not optimized or not viable for clinical practice. Nevertheless, recent studies show promising results regarding success rates of excision, neurotoxicity reversal and recovery of healthy phenotypes in in vitro and in vivo models, giving the current scenario a good future perspective.

**Keywords:** Neurodegenerative Diseases; Alzheimer's Disease; Huntington's Disease; Gene Therapy; *CRISPR/Cas9*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Comparação entre as vias de processamento da Proteína Precursora Amilóide .....	<b>6</b>
<b>Figura 2:</b> Hipóteses de mecanismos pelos quais os fragmentos A $\beta$ causam a Doença de Alzheimer de Início Precoce .....	<b>8</b>
<b>Figura 3:</b> Estrutura da Proteína Precursora Amilóide, Sítios de clivagem e Aminoácidos Propensos a Alterações. ....	<b>10</b>
<b>Figura 4:</b> Estrutura do complexo $\gamma$ -secretase transmembranar .....	<b>11</b>
<b>Figura 5:</b> Ação da Presenilina 1 na geração de fragmentos A $\beta$ 42, comparando duas conformações em que a mesma pode se encontrar .....	<b>12</b>
<b>Figura 6:</b> O gene Huntingtina, o RNA mensageiro e os fragmentos proteicos resultantes .....	<b>14</b>
<b>Figura 7:</b> Fluxograma representando os eventos que promovem a neurodegeneração na Doença de Huntington .....	<b>17</b>
<b>Figura 8:</b> Comparação anatômica entre o cérebro de um indivíduo saudável e de um com Doença de Huntington .....	<b>18</b>
<b>Figura 9:</b> Sistema <i>CRISPR-Cas9</i> em bactérias.....	<b>22</b>
<b>Figura 10:</b> Vias de reparo mediante excisão promovida pela enzima <i>Cas9</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 11:</b> Variantes da Enzima <i>Cas</i> e seus mecanismos de ação .....	<b>24</b>
<b>Figura 12:</b> Distribuição dos artigos nos quesitos de Objetos de Estudo (A), Gene Alvo (B) e Método de Transferência (C). ....	<b>28</b>
<b>Figura 13:</b> Diagrama demonstrando a ação de duas variações da enzima <i>Cas Nickase</i> ao realizar os <i>Single-strand Breaks</i> . ....	<b>30</b>
<b>Figura 14:</b> Dois ensaios de imunofluorescência para aferir a depleção da produção de APP nas células tratadas, em relação as não-tratadas.....	<b>31</b>
<b>Figura 15:</b> Sequenciamento de dois clones antes e depois da excisão promovida por <i>CRISPR-Cas9</i> , provenientes do artigo 1.....	<b>32</b>
<b>Figura 16:</b> Modelo da APP, região gênica de interesse e alvo do <i>sgRNA</i> no ensaio em modelos murinos Wild-Type .....	<b>35</b>
<b>Figura 17:</b> Ensaios realizados para demonstrar a eficiência de excisão e os níveis de fragmentos $\beta$ -amilóides após a edição.....	<b>35</b>

## LISTA DE SIGLAS

<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DH</b>	Doença de Huntington
<b>DAAP</b>	DA de Acometimento Precoce
<b>DAAT</b>	DA de Acometimento Tardio
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<b>Cas</b>	CRISPR Associated
<b>A<math>\beta</math></b>	Beta-amilóide
<b>APP</b>	Proteína Precursora Amilóide
<b>PSEN</b>	Presenilina
<b>APH</b>	<i>Anterior Pharynx Defective</i>
<b>NCT</b>	<i>Nicastrin</i>
<b>HTT</b>	Huntingtina
<b>mHTT</b>	Huntingtina Mutante
<b>WT</b>	<i>Wild-Type</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>ADA</b>	Enzima Adenosina Desaminase
<b>crRNA</b>	CRISPR-RNA
<b>tracrRNA</b>	<i>Tracer-RNA</i>
<b>sgRNA</b>	<i>Single-guide RNA</i>
<b>PAM</b>	<i>Protospacer-Adjacent Motif</i>
<b>DSB</b>	<i>Double-strand Break</i>
<b>SSB</b>	<i>Single-strand Break</i>
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous End-Joining</i>
<b>HDR</b>	<i>Homology-directed Repair</i>
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>dCas9</b>	<i>Dead Cas9</i>
<b>CAR-T</b>	<i>Chimeric Antigen Receptor – T cell</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region</i>
<b>INDELS</b>	Inserções e Deleções

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 Gerais .....	3
2.2 Específicos.....	3
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>4</b>
<b>4 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>5</b>
4.1 Doença de Alzheimer.....	5
4.1.1 Fisiopatogenia da Doença de Alzheimer.....	5
4.1.2 Genética da Doença de Alzheimer.....	8
4.1.2.1 Proteína Precursora Amilóide .....	9
4.1.2.2 Presenilinas .....	10
4.1.3 Clínica, Diagnóstico e Tratamento da Doença de Alzheimer .....	12
4.2 Doença de Huntington .....	13
4.2.1 Genética da Doença de Huntington .....	14
4.2.2 Fisiopatogenia da Doença de Huntington .....	16
4.2.3 Clínica, Diagnóstico e Tratamento da Doença de Huntington.....	18
4.3 Terapia Gênica e <i>CRISPR-Cas</i> .....	19
4.3.1 <i>CRISPR-Cas</i> .....	21
4.3.2 O Sistema <i>CRISPR-Cas</i> .....	22
4.3.3 <i>CRISPR-Cas</i> aplicado a pesquisa de doenças neurodegenerativas .....	25
4.3.4 Aplicação de <i>CRISPR-Cas</i> no âmbito da pesquisa em Doença de Huntington .....	26
4.3.5 Aplicação de <i>CRISPR-Cas</i> no âmbito da pesquisa em Doença de Alzheimer .....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas são um grupo de processos patológicos progressivos, cuja incidência tende a aumentar em função da idade. A Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Huntington (DH) são pesquisadas com o intuito de elucidar os eventos que as causam, seu diagnóstico e possíveis medidas terapêuticas a serem tomadas (SERENIKI 2008; LANE et al., 2017).

A DA é a maior causa de demência em pessoas idosas. É dividida em duas categorias, doença de Alzheimer de acometimento tardio e de Início precoce (DAAT e DAIP, respectivamente). A DAIP representa cerca de 5% dos casos da doença e tem como característica os fatores genéticos que apresentam maior relevância em sua fisiopatogenia. Os fatores genéticos associados à DA são mutações que ocorrem em genes (Como a Proteína precursora amilóide e as Presenilinas 1 e 2) relevantes na formação de fragmentos beta-amilóides, que em grandes quantidades formam placas senis, que são reconhecidas como marcadores da doença de Alzheimer, por serem neurotóxicas (SERENEKI, 2008; LANE et al., 2017).

A DH, assim como a DAIP, é hereditária e inevitavelmente progressiva. Ocorre porque no gene da Huntingtina existem repetições das bases C, A e G. Quando o número destas trincas CAG chegam em 36 repetições, a proteína pode apresentar uma cauda de poliglutamato, que é capaz de promover obstrução intracelular e fenômenos de neurotoxicidade. (BARSOTTINI, 2007).

A presença de doenças incuráveis de alto impacto social e de saúde faz necessário o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas, tendo em vista que as terapias convencionais atuam apenas como postergadoras dos eventos progressivos das doenças neurodegenerativas (SANTOS, 2017).

Dentre as novas medidas terapêuticas sendo pesquisadas atualmente, destacam-se as medidas baseadas em terapia gênica. A terapia gênica engloba os métodos que tem como foco a aplicação de ferramentas moleculares capazes de alterar fragmentos, sejam estes grandes ou pequenos, de *DNA*. As metodologias para promover a edição de *DNA* humano variam, desde o método de transfecção das ferramentas de edição, até as ferramentas de edição em si (ANGUELA; HIGH, 2019).

Dentre as ferramentas de edição gênica, o sistema *CRISPR-Cas9* ganha notoriedade dada a capacidade da enzima *Cas9*, guiada por moléculas de RNA guia, de clivar regiões únicas (de até um par de bases) ou coletivas (genes inteiros) do *DNA* humano. A aplicabilidade do sistema nas causas genéticas de DH e DAIP é pesquisada no âmbito de medidas terapêuticas. No caso, pesquisas têm sido realizadas com foco em remover fragmentos de genes mutados que são conhecidos por causar doenças. Além da remoção de mutações, é possível alterar proteínas de modelos saudáveis, com objetivo de atenuar os fenômenos observados durante o processo patológico (SHIN et al., 2016; DABROWSKA et al., 2018; GYÖRGY et al., 2018; ORTIZ-VIRUMBRALES et al., 2017; SUN et al., 2018; AREND, 2017)

Este trabalho visa realizar uma breve revisão das doenças de interesse (DA e DH), do sistema *CRISPR-Cas* e analisar a metodologia e os resultados de pesquisas que aplicam o sistema *CRISPR-Cas* em modelos da DA e da DH com objetivo de propor possíveis medidas terapêuticas para estas doenças.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Analisar pesquisas que utilizam da técnica de excisão por *CRISPR/Cas9* na doença de Huntington e na doença de Alzheimer, tendo como foco pesquisas que visam promover medidas terapêuticas.

### 2.2 Específicos

- Realizar uma breve revisão dos aspectos fisiopatológicos das doenças de Huntington e Alzheimer, tendo como foco os aspectos moleculares que ocasionam a doença e que podem ser alvos para a técnica de excisão por *CRISPR/Cas9*;

- Descrever técnica de *CRISPR/Cas9*, tendo como foco o seu mecanismo molecular e o potencial da técnica para terapia gênica em Doença de Huntington (DH) e Doença de Alzheimer (DA);

- Realizar breves comparações das metodologias de pesquisas que visem a edição genética de modelos da DA e da DH, visando compreender os motivos que levaram a escolha de tais metodologias.

### 3 METODOLOGIA

As revisões bibliográficas seguem um modelo de revisão bibliográfica narrativa, com foco qualitativo. Foram realizadas por intermédio de bibliografia básica relevante ao tema, como livros didáticos consolidados e artigos publicados em revistas e jornais, com certas restrições de data de publicação, sendo que grande parte das referências partem de 2010 e vão até 2019, por motivos de contexto histórico, publicações que datam até 1972 foram utilizadas.

Os artigos que foram analisados e comparados foram provenientes de bases de dados e sistemas de busca, como Google Acadêmico, Pubmed e Bireme. Para que o artigo fosse analisado por este trabalho, foi necessário que atingisse três critérios: 1) Tratar de *CRISPR-Cas* e variantes do sistema; 2) Ter como foco modelos experimentais das doenças de Huntington ou de Alzheimer; 3) Ter o objetivo de promover efeitos terapêuticos por meio da edição gênica. Para a pesquisa em bases de dados e mecanismos de busca foram utilizadas as palavras-chave (descritores de saúde): Doenças neurodegenerativas; Doença de Alzheimer; Doença de Huntington; Terapia gênica e *CRISPR/Cas9*, em português e inglês.

## **4 DESENVOLVIMENTO**

### **4.1 Doença de Alzheimer**

Em 1907, Aloisius Alzheimer descreveu os sintomas de uma paciente de 51 anos, em Frankfurt, na Alemanha. Em meio a descrição das ações da paciente frente a tarefas comuns, como ler e utilizar ferramentas, Alzheimer notou a tendência que a paciente tinha de descontinuar suas atividades, pois a mesma acabava por se esquecer de ações que estava executando no momento. Atualmente, esta é considerada a primeira descrição de um paciente acometido pela Doença de Alzheimer (DA), que é caracterizada por perda gradual de memória (de curto e, eventualmente, longo prazo) e funções cognitivas (BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017).

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência associada a idade no mundo. É responsável por cerca de 50% destes casos. Sua prevalência parece estar fortemente associada a idade visto que a prevalência é de 2.8/1000 indivíduos entre 60 e 65 anos e de 56.1/1000 indivíduos com mais de 90 anos. Apesar do fator de idade ser maior determinante do desenvolvimento da doença, a DA se apresenta em dois grandes subtipos, diferenciados principalmente pela idade na qual a doença se estabelece. São estes subtipos a Doença de Alzheimer de Início Tardio (DAIT) e a doença de Alzheimer de Início Precoce (DAIP) (BEKRIS et al., 2010).

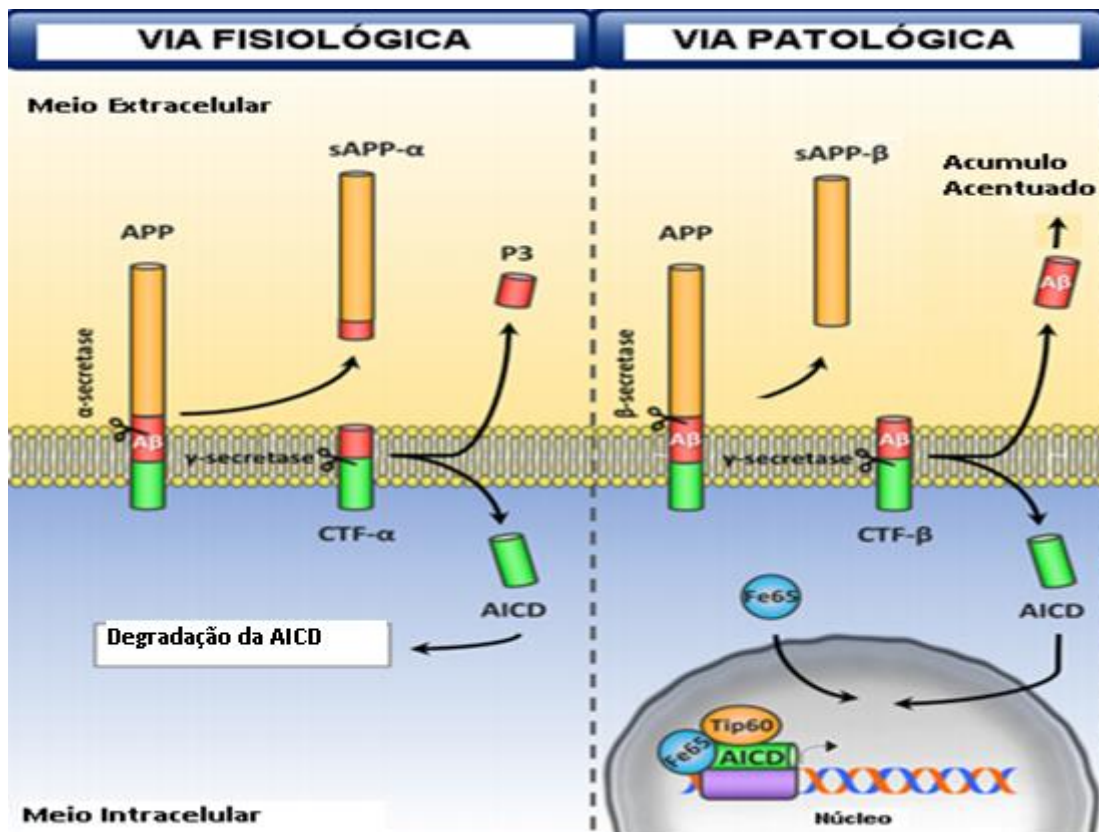
Os casos de DAIT tem maior prevalência, pois como dito anteriormente, a DA tende a se desenvolver conforme a idade do paciente avança. Apesar disso, pode-se identificar fatores genéticos que predispõem ao desenvolvimento do outro subtipo da doença, a DAIP, que representa de 1 a 5% de todos os casos de DA e afeta indivíduos de 30 até 65 anos (BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017).

#### **4.1.1 Fisiopatogenia da Doença de Alzheimer**

Ao longo de seu desenvolvimento, o estudo da DA contou com a formulação de diferentes hipóteses para o estabelecimento do processo patológico. Dentre essas hipóteses, cinco se destacam por serem as mais estudadas, são elas: a hipótese da Cascata  $\beta$ -amilóide; a hipótese das presenilinas; a hipótese da desregulação de íons cálcio; a hipótese da desregulação lisossomal; e hipótese das proteínas Tau (KOCAHAN; DOĞAN, 2017).

Com maior frequência, estudos correlacionam a DAIP com a deposição de fragmentos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) no espaço extracelular, cujo processo de formação é evidenciado na **Figura 1**, considerando que a intensidade de tal deposição pode não estar diretamente correlacionado com o grau de déficit cognitivo e de memória do indivíduo afetado (KOCAHAN; DOĞAN, 2017).

**Figura 1: Comparação entre as vias fisiológica e patológica de processamento da Proteína Precursora Amilóide**



**Fonte:** Adaptado de (CORONEL et al., 2018)

A APP pode ser processada por três complexos enzimáticos denominados secretases ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$ -secretases). Quando processada pela  $\alpha$  e pela  $\gamma$  secretases em sequência, o produto final da degradação da APP será o domínio intracelular da APP (AICD) que é degradado no interior da célula, um fragmento peptídico (P3) e a porção extracelular da APP (sAPP $\alpha$ ), que atua como fator de crescimento e tem efeitos neuroprotetivos. Por outro lado, se a APP for processada pela  $\beta$ -secretase seguida da  $\gamma$ -secretase, produz produtos como os fragmentos  $\beta$ -amilóides e AICD de comprimento variado, capaz de interagir com outras proteínas e atuar como fator transcricional. Além disso, o sAPP $\beta$  não confere a neuroproteção provida pelo sAPP $\alpha$  e estudos indicam que o mesmo possa ser neurotóxico. Dependendo do tipo de mutação que ocorre na APP ou nas presenilinas, o tamanho do fragmento  $\beta$ -amilóide pode variar num intervalo de dois peptídeos, sendo os fragmentos denominados  $A\beta$ 40 e  $A\beta$ 42.

Laganowsky e colaboradores (2012), em seu estudo, demonstraram como os fragmentos  $A\beta$  interagem para formar estruturas oligoméricas, que são instáveis e polimórficas e podem formar dímeros e até mesmo fibrilas. Tais estruturas formadas

pelo acúmulo de A $\beta$  podem se estruturar em menos de 24 horas no espaço extracelular prejudicando a depuração dos fragmentos A $\beta$  monoméricos.

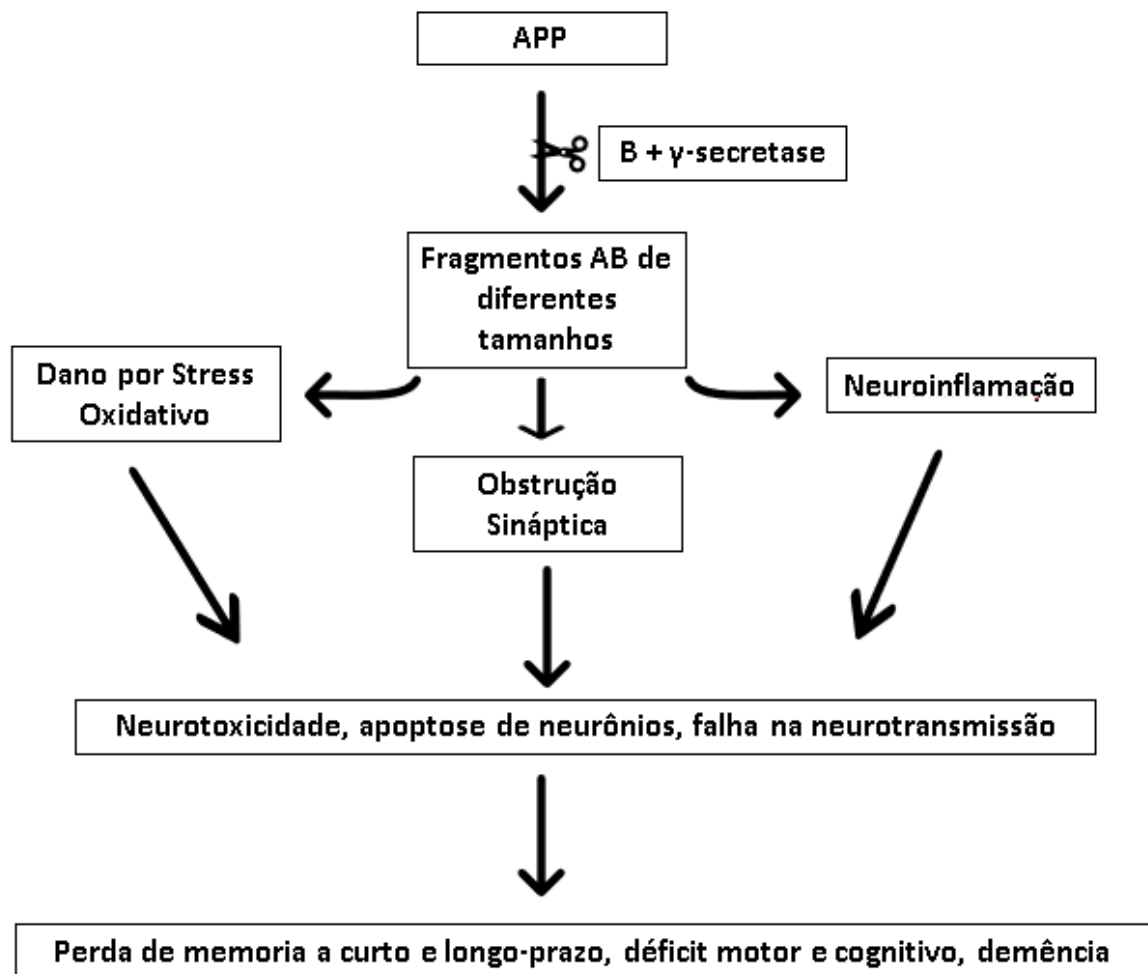
Por mais que os mecanismos específicos pelos quais os fragmentos A $\beta$  (em particular o A $\beta$ 42) promovem neurotoxicidade não estejam completamente elucidados, é possível estabelecer uma correlação direta entre as mutações que ocorrem em sítios de clivagem da APP (mutações nos sítios da  $\gamma$  e da  $\beta$ -secretases) e nas presenilinas com a Doença de Alzheimer de Início Precoce (CORONEL et al., 2018).

Portanto, a DAIP tende a ocorrer quando existem mutações na Proteína Precursora Amilóide (APP, em inglês) ou nas secretases responsáveis por sua clivagem. Quando a APP é clivada de forma que ela forme mais fragmentos insolúveis do que solúveis no meio extracelular, aqueles que são insolúveis predisõem parte do processo patológico, pois estes formam aglomerados conhecidos como placas senis, que dificultam a transição de neurotransmissores entre neurônios. Os genes da APP e das secretases são, portanto, os mais relevantes para o desenvolvimento da DAIP, que tem caráter hereditário. Os fenômenos gerais envolvidos na produção dos fragmentos amilóides de tamanhos variados, a partir da clivagem da APP por intermédio das secretases, está elucidado na **Figura 2** (CORONEL et al., 2018; JANSEN et al., 2003).

Hipóteses foram formuladas para definir os mecanismos pelos quais o acúmulo de fragmentos A $\beta$  levam a doença de Alzheimer, como a promoção de eventos inflamatórios mediada por células da micróglia (sistema imunológico do sistema nervoso central), que liberam citocinas pró-inflamatórias no interstício neuronal. Pode ser citada, também, a capacidade de se aglomerar dos fragmentos A $\beta$ , permitindo uma possível obstrução de sítios sinápticos (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015)

Acredita-se que os aglomerados de A $\beta$  também promovem danos oxidativos nas células adjacentes, em especial os oligodendrócitos, que atuam na manutenção e formação da bainha de mielina de neurônios. O dano oxidativo é mais acentuado nestas células porque seu conteúdo de glutathione reduzida, que é responsável por neutralizar espécies reativas, é consideravelmente baixo. O dano em tais células causa redução no conteúdo mielínico dos axônios de neurônios, prejudicando o processo de neurotransmissão (GALIMBERTI; GHEZZI; SCARPINI, 2013).

**Figura 2: Hipóteses de mecanismos pelos quais os fragmentos A $\beta$  causam a Doença de Alzheimer de Início Precoce**



**Fonte:** Adaptado de (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015)

A APP, mediante clivagem pela  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases, irá gerar fragmentos  $\beta$ -amilóides de tamanhos diferentes. Tais fragmentos podem causar danos por meio de stress oxidativo, obstrução sináptica e neuroinflamação. Tais fenômenos predisõem a neurotoxicidade e apoptose de neurônios, levando a falhas na neurotransmissão. Tais eventos justificariam os sinais e sintomas observados na DA, como perda de memória, déficits motores e cognitivos e demência.

#### 4.1.2 Genética da Doença de Alzheimer

Pesquisas já associaram genes mutados que estão presentes e são relevantes para a fisiopatogenia da doença, mas nenhum gene pode ser considerado fator causal da doença. Por outro lado, genes mutantes que foram considerados causadores coletivos da doença de Alzheimer são frequentemente associados a DAIP, que apresenta hereditariedade autossômica dominante (BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017).

Como evidenciado em estudos genéticos de populações com Alzheimer, as mutações que são mais associadas com desenvolvimento de DAIP são na proteína precursora amilóide (PPA ou APP, em inglês) e presenilinas PSEN1 e PSEN2. Em um estudo Janssen et al. (2003) estudaram a incidência de mutações em 31 famílias em que ocorreu DAIP. Deste total de 31 famílias, 21 tiveram a mutação na PSEN1 ou na APP, mostrando, em uma pequena amostra, uma incidência de 68% destas mutações nos casos de DAIP. Tal incidência elevada justifica a atribuição destes genes como os fatores causais mais comuns da DAIP (JANSSEN et al., 2003; BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017).

#### 4.1.2.1 Proteína Precursora Amilóide

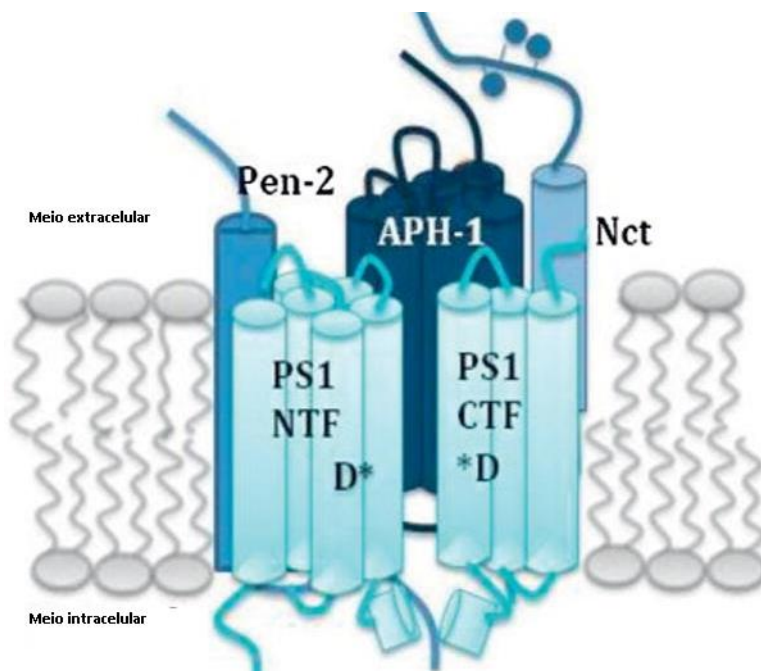
O gene APP, localizado no cromossomo 21q21, codifica uma proteína transmembranar com múltiplos domínios, que leva o mesmo nome do gene. Sua função primária ainda não foi elucidada, mas já foi associada a plasticidade neural e a formação de sinapses. Mutações na APP, como representadas na **Figura 3**, nos sítios onde atuam as secretases podem levar a aumento de fragmentos AB amiloides gerados durante o processamento da APP, sendo que algumas mutações, como a Swedish APP ou a London APP são as mais estudadas, pois tiveram grande impacto no desenvolvimento de pesquisas acima da DA. A London APP, no caso, é considerada a mutação mais frequentemente associada ao desenvolvimento da DAIP, no mundo. Tais mutações levam estes nomes porque, na primeira vez que foram identificadas, foram encontradas em famílias suécas (*Swedish*) e londrinas (*London*) (BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017; CORONEL et al., 2018).

O sítio de clivagem da  $\gamma$ -secretase se encontra no domínio transmembranar da APP, grande parte das mutações que conhecidamente causam a DAIP ocorrem nesta região. Dezenas destas mutações podem ocorrer, seja no sítio de clivagem da  $\gamma$ -secretase,  $\beta$ -secretase ou regiões adjacentes a estas. Apesar de que as mutações da APP são as mais estudadas, não são só elas que podem intensificar a produção de fragmentos  $\beta$ -amilóides. Por serem produtos de reações catalisadas por enzimas, as enzimas processadoras da APP, como a  $\beta$ -secretase e a  $\gamma$ -secretase também podem sofrer mutações em seus genes. Tais mutações são amplamente estudadas afim de aferir a alteração que elas causam no processamento da APP.



sabe que a conformação das PSEN's irá ditar qual o tipo de fragmento A $\beta$  que será formado. A conformação “fechada” da PSEN1 é a responsável por formar os fragmentos A $\beta$ 42, que são os mais hidrofóbicos e tem maior tendência em se agregar e formarem placas senis. Tal conformação varia de acordo com a mutação que ocorre na PSEN1, como representado na **Figura 5** (ZOLTOWSKA; BEREZOVSKA, 2017).

**Figura 4: Estrutura do complexo  $\gamma$ -secretase transmembranar**



**Fonte:** Adaptado de (CARROLL; LI, 2016)

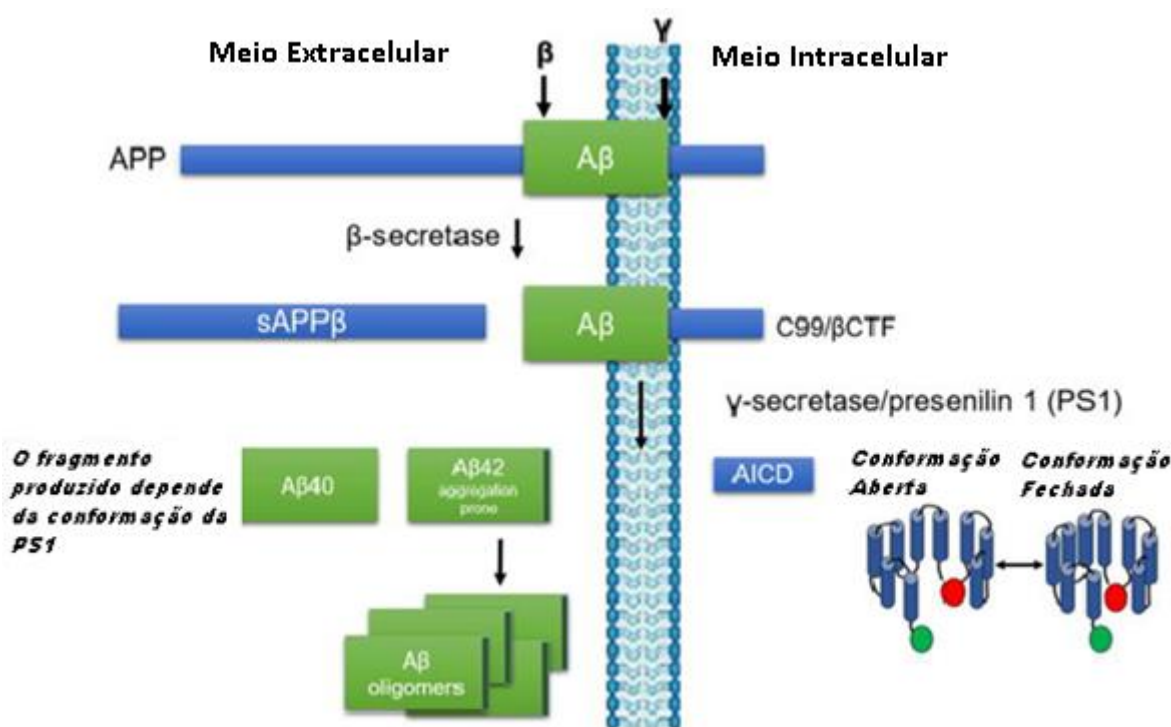
O complexo  $\gamma$ -secretase é composto por 4 subunidades proteicas. A APH1 (*Anterior Pharynx Defective-1*), a NCT (*Nicastrin*), a PEN-2 ou PSEN2 e a PS1 ou PSEN1. A PSEN1 contém dois domínios, cada um contendo um fragmento terminal (C-terminal e N-terminal) e uma porção do sítio catalítico (\*D). Dependendo da conformação estabelecida pelos dois domínios da PSEN1, a atividade catalítica conferida ao complexo  $\gamma$ -secretase será maior ou menor.

Já o gene PSEN2, localizado no cromossomo 1q42.13, tem menor relevância epidemiológica, pois é a mais rara causadora de DAIP. As mutações na PSEN2 se diferem da PSEN1, pois as mutações da PSEN2 têm menor penetrância e podem ser sobrepostas por outros genes/fatores ambientais e, por isso, tem sua ocorrência apenas em idades mais avançadas (a partir de 40 anos) (TANDON; FRASER, 2002).

Acredita-se que mutações nas presenilinas aumentariam a proporção de fragmentos  $\beta$ -amilóides 42 (A $\beta$ 42, conhecidos por serem mais hidrofóbicos) em relação aos  $\beta$ -amilóides 40, que são menos hidrofóbicos e tem menor tendência a

desenvolver placas senis, como indica a **Figura 5**. Porém, em um estudo, Sun e colaboradores (2016) notaram que, das 138 mutações que afetam a PSEN1 e que foram extraídas de pacientes com DAIP, apenas 34 variantes apresentavam aumento da razão A $\beta$ 42/ A $\beta$ 40 implicando a existência de mais de um mecanismo que as mutações na PSEN1 empregam para estabelecer o processo patológico da DAIP. (KELLEHER; SHEN, 2017).

**Figura 5: Ação da Presenilina 1 na geração de fragmentos A $\beta$ 42, comparando duas conformações em que a mesma pode se encontrar**



**Fonte:** Adaptado de (ZOLTOWSKA; BEREZOVSKA, 2017)

Está representada a ação de ambas as enzimas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase no processamento da APP. A  $\beta$ -secretase, ao processar a APP, gera os fragmentos sAPP $\beta$ , que permanecem dispersos no meio extracelular. Quando a enzima  $\gamma$ -secretase atua no fragmento remanescente da APP, ocorre a formação do fragmento A $\beta$ . Dependendo da conformação da PSEN1 (PS1, nas figuras 4 e 5) o fragmento formado será diferente. A conformação irá depender da aproximação ou distanciamento dos sítios catalíticos (círculos verde e vermelho) dos dois domínios da PSEN1. A conformação fechada da PSEN1 é a responsável por formar os fragmentos A $\beta$ 42, que são os mais hidrofóbicos e tem maior tendência em se agregar e formarem placas senis. Tal conformação varia de acordo com a mutação que ocorre na PSEN1 (ZOLTOWSKA; BEREZOVSKA, 2017).

#### 4.1.3 Clínica, Diagnóstico e Tratamento da Doença de Alzheimer

Em geral, o primeiro aspecto clínico da DA é a perda da memória recente. Um desafio na identificação e diagnóstico de doenças neurodegenerativas é que a grande parte dos sinais clínicos estão presentes em todas elas. Sequencialmente com a

progressão da neurodegeneração, o paciente tende a desenvolver déficit de fala, cognição e motores. O diagnóstico é realizado a partir da presença de marcadores como proteína tau hiperfosforilada ou fragmentos  $\beta$ -amilóides. Para um diagnóstico definitivo da DA, é necessária a combinação dos fatores clínicos, laboratoriais e de imagens de um paciente (LANE; HARDY; SCHOTT, 2017).

O tratamento da Doença de Alzheimer é focado, particularmente, em inibidores da acetilcolinesterase, pois na hipótese colinérgica da doença de Alzheimer, um déficit em neurônios colinérgicos estaria causando diminuição na produção e secreção de tal neurotransmissor, impedindo que o mesmo atue excitando diversas vias do sistema nervoso central.

Por ser uma doença incurável, qualquer metodologia terapêutica atualmente utilizada para a doença de Alzheimer, como os inibidores da acetilcolinesterase ou antidepressivos para os sintomas clínicos, tem como objetivo postergar os eventos progressivos da doença e não a curar.

## **4.2 Doença de Huntington**

A doença de Huntington (DH) foi descrita pela primeira vez em 1872 por George Huntington, como uma coreia hereditária. É uma síndrome neurodegenerativa que leva a movimentos involuntários e repetitivos (que recebem o nome de coreia, que significa “dança”) e déficit cognitivo aos acometidos.

Seguindo a primeira descrição da coreia de Huntington, outros pesquisadores contribuíram para o avanço dos conhecimentos acima da síndrome, como Theodor Meynert (1877), que associou os eventos da coreia com a degeneração de regiões do sistema nervoso central, mais especificamente do núcleo caudado, e J.F. Gusella (1983) que, pela primeira vez, identificou o gene cuja mutação é responsável por uma doença, no caso, o gene da Huntingtina (HTT).

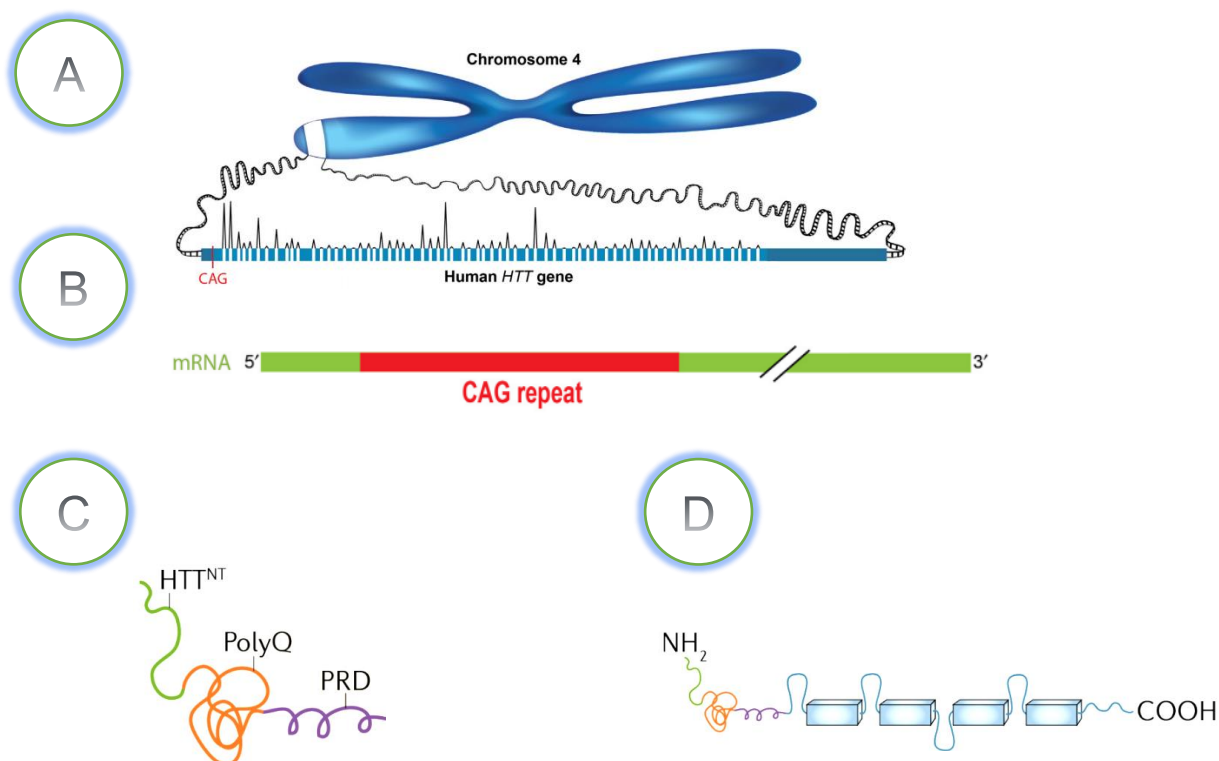
Sabe-se que a DH não só afeta regiões do núcleo caudado, mas toda a região do estriado (incluindo todos os núcleos da base) e do córtex cerebral, responsáveis por grande parte das funções do sistema nervoso central. A doença se desenvolve de forma crônica e inevitavelmente progressiva (HUNTINGTON, 1872; GUSSELLA, 1983; COSTA 2013; GIL-MOHAPEL, 2011; MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

### 4.2.1 Genética da Doença de Huntington

A doença de Huntington ocorre por mutação no gene Huntingtina (HTT) que contém 180 kb, 67 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 4, mais especificamente em 4p16.3 (**Figura 6**) (SAUDOU; HUMBERT, 2016).

A mutação que leva a DH é autossômica e dominante, é caracterizada pela adição de repetições CAG na extremidade 5' do gene (como indicado na **Figura 6**), que conseqüentemente levam a adição de uma cauda de poliglutamina na proteína final. Devido a tal mutação, dependendo do número de repetições CAG que foram adicionadas no gene, a cauda de poliglutamina será o fator que levará ao estabelecimento da DH. Se no indivíduo as repetições forem mais de 39, é provável que o mesmo desenvolva a DH (MCCOLGAN, TABRIZI, 2017).

**Figura 6: O gene Huntingtina, o RNA mensageiro e os fragmentos proteicos resultantes**



**Fonte:** Adaptado de (DÉGLON *et al.*, 2017)

Em A, nota-se o cromossomo 4 e o gene da HTT, junto com a região onde se adicionam as repetições CAG. Em B, o RNA mensageiro resultante da transcrição do gene da HTT, com as repetições de CAG na extremidade 5' e a região de *splicing* anômalo, que ocorre quando a HTT é mutante. Em C, o fragmento de HTT proveniente de *splicing* anômalo nomeado HTT éxon 1, com a região da extremidade N, a cauda de poliglutamina (polyQ) e a região rica em prolina, que se mantém conservada. Por fim, em D, a HTT mutante nativa com todos os domínios e a extremidade C.

Além do prolongamento de CAG no gene HTT, outros genes podem alterar a progressão dos sinais motores da doença. Em um estudo, Moss e colaboradores (2017) tiveram como objetivo definir a progressão da doença a partir do genótipo dos pacientes em diferentes estágios de dificuldade motora, utilizando referenciamento de todo o genoma de pacientes com a HTT mutante de diferentes bancos de dados. Nesta comparação, percebeu-se um padrão estatisticamente significativo de mutações em três genes do cromossomo 5 (MSHF, DHFR e MTRNR2L2) entre os pacientes acometidos pela DH. Tal padrão pode ser significativo, indicando que os genes envolvidos possam, não causar a doença em si, mas alterar o curso da mesma.

Por ser uma doença autossômica dominante, as chances de um casal em que pelo menos uma das pessoas tem a doença de ter um(a) filho(a) acometido vai de 50% a 75%, sendo que, de acordo com Telenius et al. (1994), um pai que contenha em seu gene da HTT uma quantidade intermediária de repetições CAG (de 30 à 35 repetições) apresenta chances maiores de ter um filho com repetições patogênicas de CAG (>38), visto que espermatozoides apresentam maior variabilidade de repetições, com mais repetições longas em relação aos outros tecido tecidos somáticos (DÉGLON et al, 2017).

Um fator que está diretamente relacionado com a incidência de DH em certas populações é o tamanho, em média, das repetições de CAG encontradas no gene da HTT nativa. Ao analisar a diferença na incidência da DH em populações provenientes da Europa e em populações asiáticas foi observado que, em média, pessoas de ancestralidade europeia tem cerca de 18,4 a 18,7 repetições CAG, quando saudáveis. Por outro lado, vemos que os indivíduos que têm ancestralidade asiática têm, em média, de 17,9 a 18,4 repetições no gene da HTT. Tais dados podem ser correlacionados com a incidência da doença, que é de 10-13/100.000 habitantes em populações europeias e de 1-7/1.000.000 em populações asiáticas, possivelmente porque indivíduos com uma maior quantidade de CAG no gene não-mutado, precisam de menos adições de repetições para alcançar o limite inferior (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

Ou seja, os indivíduos que já têm, naturalmente, um número maior de adições CAG no gene HTT, estão mais próximos do limite inferior de repetições da DH e, portanto, estão mais propícios a desenvolver a doença (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

#### 4.2.2 Fisiopatogenia da Doença de Huntington

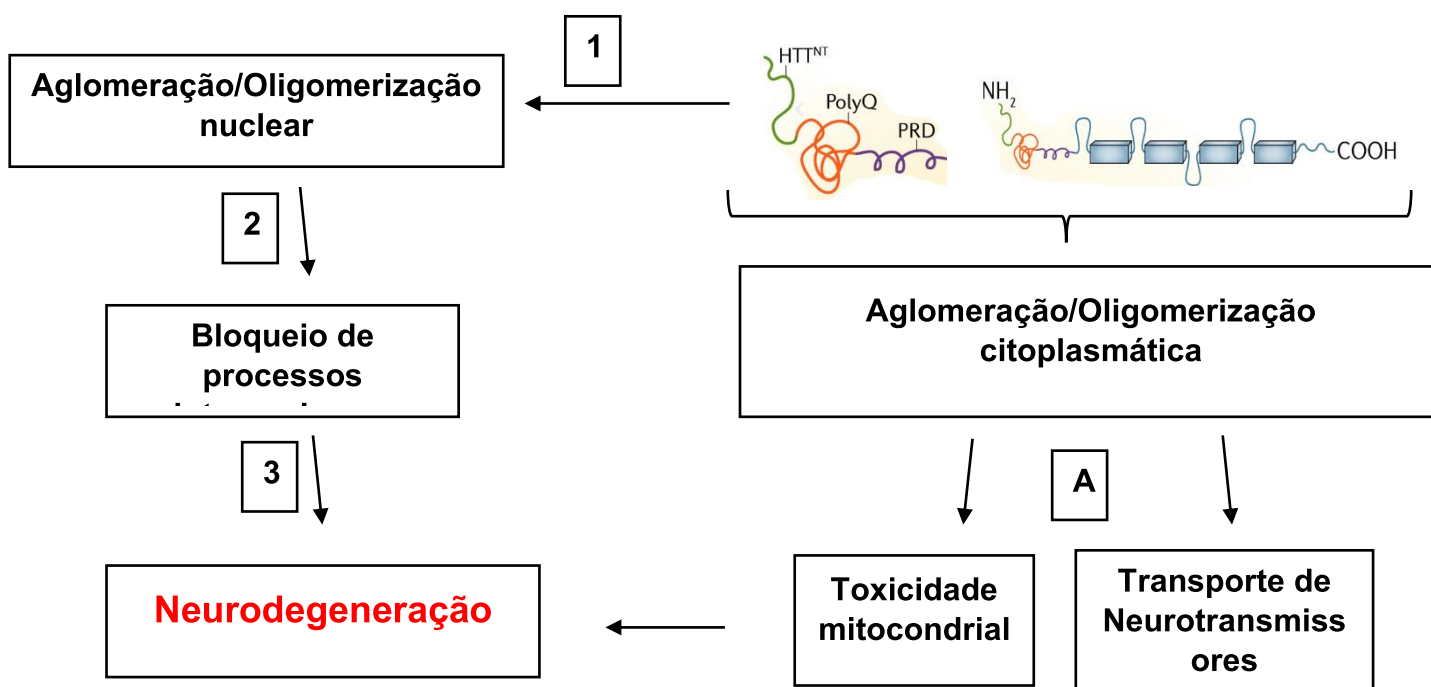
A huntingtina WT (Wild-Type), que é o gene da HTT encontrado em indivíduos saudáveis, com menos de 38 repetições de CAG, está envolvida em mecanismos de sinalização intracelular, interação com proteínas que envolvem endocitose mediada por claritina, transmissão de sinais pós-sinápticos. Esta proteína atua como mediadora de interação entre vesículas carreadoras e proteínas motoras, assim como na interação com fatores de transcrição, embora o mecanismo de atuação com outros fatores de transcrição ainda não tenha sido elucidado.

A huntingtina mutante, quando traduzida, pode afetar a funcionalidade do sistema nervoso central por uma série de fatores, indicados na **Figura 7**, como neurotoxicidade, proteostase intranuclear (obstrução das vias de transporte de proteínas em vesículas), aglomeração/oligomerização citoplasmática e nuclear, além do cessamento das atividades a proteína tem quando a mesma se encontra em estado fisiológico (HARJES; WANKER, 2003; MCCOLGAN; TABRIZI, 2017; AROSS; TABRIZI, 2011).

Ao ser formado, o RNA mensageiro da HTT pode sofrer *splicing* anômalo, que irá gerar um fragmento proveniente do éxon 1 (HTT éxon 1) e outros fragmentos. Se não sofrer o *splicing*, será formada uma HTT WT, que contém a cauda de poliglutamina do tamanho correspondente ao tamanho da expansão de poliglutamina no gene HTT.

A HTT éxon 1 é capaz de adentrar o núcleo celular. No interior do núcleo, fragmentos de HTT éxon 1 irão interagir entre si e formar inclusões intranucleares, que irão causar sequestro de outras proteínas, como fatores de transcrição e enzimas de processos nucleares, fenômeno que pode desregular os processos de transcrição, visto que além do sequestro, a própria presença de aglomerados no interior do núcleo causa acometimento negativo nos processos de transporte de proteínas nucleares como elucidado na **Figura 7** (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

**Figura 7: Fluxograma representando os eventos que promovem a neurodegeneração na Doença de Huntington**



**Fonte:** Adaptado de (MCCOLGAN, TABRIZI, 2017).

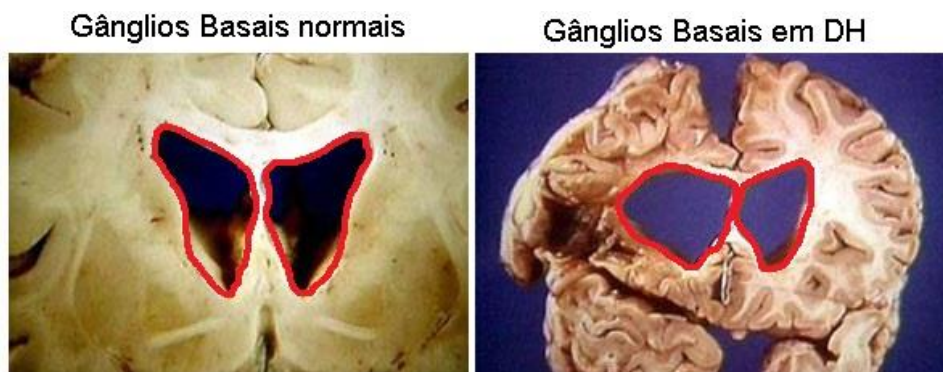
1 - Ocorre a transferência do fragmento HTT éxon 1 para o núcleo celular. 2 - Sequestro e obstrução mecânica as aglomerações prejudicam a atuação do *DNA* da célula. 3 - A presença dos aglomerados proteicos no interior do núcleo leva a apoptose celular. A - Nota-se a aglomeração da HTT nativa que, ao contrário do fragmento éxon 1, permanece no citoplasma, onde gera aglomerados de proteínas e componentes citoplasmáticos. Tais aglomerados, graças a abdução de componentes celulares e obstrução do espaço do corpo celular dos neurônios, leva a toxicidade mitocondrial, causando desbalanço energético (que leva a morte celular) e prejudica o transporte dos neurotransmissores ao axônio (Bates et al., 2015).

A toxicidade mitocondrial que se nota no caso da HTT mutante ocorre porque, além do cessamento dos transportes vesiculares promovidos pela HTT nativa, a HTT mutante forma fragmentos tóxicos a partir da região N-terminal. Além disso, graças a cauda de poliglutamina, a ação de proteases responsáveis por degradar fragmentos proteicos anômalos e tóxicos acaba por ser prejudicada. Isso ocorre, possivelmente porque a interação destas enzimas tende a ocorrer no próprio fragmento de poliglutamina e com a região rica em prolina, que se encontra truncada (ARROS; TABRIZI, 2011; MCCOLGAN; TABRIZI, 2017).

Ao observar os fenômenos de neurodegeneração macroscopicamente, é possível observar a degeneração de regiões de núcleos basais, como o núcleo caudado e o *putâmen*, além de degeneração do *nucleus accumbens* e do globo pálido

em menor extensão, como evidenciado na **Figura 8**. A doença pode ser classificada em 5 estágios envolvendo, progressivamente, mais áreas do SNC afetadas, além da extensão dos danos causados pela neurodegeneração (MCCOLGAN; TABRIZI, 2017)

**Figura 8: Comparação anatômica entre o cérebro de um indivíduo saudável e de um com Doença de Huntington**



**Fonte:** Adaptado de (LIOU, 2010)

Diferença no tamanho do espaçamento dos ventrículos cerebrais (circundados em vermelho) entre os indivíduos saudáveis e os acometidos por DH. O aumento na cavidade se dá, na verdade, pela degeneração da massa branca ao redor dos ventrículos. Tal massa branca é justamente a região dos núcleos basais, que são os mais acometidos na DH.

#### 4.2.3 Clínica, Diagnóstico e Tratamento da Doença de Huntington

No caso dos distúrbios motores, a doença pode apresentar uma fase hipercinética (coreia), que tende a um platô mediante progressão crônica e uma fase hipocinética, que depende da duração da doença e do tamanho do fragmento CAG presente na proteína (ROSS et al., 2014).

O diagnóstico é feito a partir de: 1) histórico familiar com a doença presente nos pais (atua apenas como corroboração), 2) testes genéticos, como sequenciamento, para análise do tamanho da repetição CAG presente, sendo que até 35 repetições CAG o paciente se encontra abaixo do limite inferior de repetições e 3) testes de avaliação motora do paciente, para confirmação da coreia (ROSS et al., 2014).

Atualmente, a DH é incurável e o tratamento é baseado no manejo, por parte de uma equipe multiprofissional, da qualidade de vida do paciente. No caso da coreia causada pela DH, o uso de tetrabenazina é recomendado, visto que o mesmo inibe a captação de monoaminas por vesículas no interior de neurônios pré-sinápticos, diminuindo a ação das mesmas em relação aos movimentos involuntários (ROSS et al., 2014; SAVANI, 2006).

Para os problemas cognitivos relacionados a DH, recomenda-se inibidores da Colinesterase, com o objetivo de aumentar a concentração de Acetilcolina nas fendas sinápticas e como consequência aumentar, no geral, a atividade cerebral do indivíduo acometido (ROSS et al., 2014). No caso dos problemas psiquiátricos, não se recomenda intervenção farmacoterápica, visto que tais alterações, como comportamento compulsivo-obsessivo e irritabilidade podem, não necessariamente, ser uma consequência direta dos mecanismos patogênicos da DH (ROSS et al., 2014; MCCOLGAN; TABRIZI, 2017). Sendo, assim como a DA, incurável e progressiva, são necessárias pesquisas acima de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Huntington.

### **4.3 Terapia Gênica e *CRISPR-Cas***

Terapia gênica é o nome dado a técnicas que tem como base a alteração de genes presentes em organismos, ou a inserção de genes em organismos, tendo como foco a abordagem terapêutica, ou seja, dar a um organismo um gene saudável ou alterar um gene patogênico (VERMA, 2016).

Em meados de 1950, com a descoberta da composição e estrutura da molécula de *DNA* por cientistas como Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick, que a genética humana teve avanço significativo. Na década de 70, o desenvolvimento da tecnologia do *DNA* recombinante levou a novos caminhos na área de biotecnologia quando Jackson et al. (1972) utilizaram mecanismos virais para inserir fragmentos de *DNA* em células de mamíferos, tendo células funcionais que são capazes de sintetizar produtos não inerentes a elas (LINDEN, 2010; FRIEDMANN, 1997).

O primeiro relato do uso de vetores virais para inserir elementos gênicos em células humanas, com finalidade terapêutica foi feito por BLAESE (1995), que realizou a transferência mediada por mecanismos retrovirais do gene da enzima adenosina desaminase (ADA) em células T de duas crianças com imunodeficiência severa combinada. Com o sucesso da técnica, foi concluído que a mesma deveria ser vista como uma alternativa eficiente para o tratamento de doenças genéticas. Até o momento, terapia gênica envolvendo técnicas de integração do *DNA* por mecanismos retrovirais foram as mais utilizadas em ensaios clínicos. Por mais que sejam mecanismos efetores de alta eficiência para integrar material genético na célula do hospedeiro, existem pontos negativos relacionados ao uso de vírus geneticamente

modificados, como o fato de que tais vetores podem ter *DNA* viral residual que pode ser imunogênico e citopatogênico. Apesar de ser a mais utilizada em técnicas de entrega de material genético, por ter opções variadas de vetores virais, com diferentes especificidades, a terapia gênica por meio de vetores não-virais também é viável, pois utiliza outros mecanismos para integração do *DNA* em células de tecidos alvo (LEDLEY, 1995; AZALDUMBIDE, 2007).

Exemplos de técnicas de entrega de genes por vetores não-virais são: plasmídeos livres de célula ou “plasmídeos nus”, lipídios catiônicos e carreadores poliméricos. Os plasmídeos nus não são utilizados como modelos de entrega para a terapia gênica *in vivo*, pois a agregação de um *DNA* livre envolve o envio de pulsos elétricos pelas células, com o objetivo de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática a elementos gênicos livres. Os lipídios catiônicos são boas alternativas, presentes em muitos produtos como reagentes comerciais, pois tem capacidade de interagir com o *DNA* e, por serem lipídicos, tem alta afinidade pela bicamada fosfolipídica das células. Por fim, os carreadores poliméricos, como a polietilenoimina, são o padrão-ouro para entrega gênica não-viral, pois podem condensar o *DNA* em esferas nanométricas e são biodegradáveis, podendo ser excretados do organismo humano após a terapia ter sido efetuada (VERMA, 2016).

Por vezes, a terapia gênica se baseia, não só na adição de novos fragmentos gênicos a um genoma, mas na edição de genes presentes naquele organismo. Por isso, há o uso de certas endonucleases que são capazes de clivar fragmentos de *DNA*. Tais nucleases são programáveis e podem ser guiadas a remover e/ou adicionar fragmentos específicos de material genético em pontos específicos de um genoma. Exemplos destas nucleases programáveis são os dedos de zinco (zinc finger nucleases), mega nucleases, as TALE nucleases e as Cas nucleases (CHEVALIER, 2002).

No momento, a procura por alternativas com alta especificidade e eficiência para alterar sequências de *DNA* é realizada na pesquisa com células de mamíferos *in vitro* para a terapia gênica. Um destes métodos é o sistema *CRISPR*-Cas, que provém de *loci* específicos de células bacterianas para realizar alterações em fragmentos grandes ou pequenos de *DNA*. (SANTOS, 2017; ZHANG, 2016; CONG, 2013).

### 4.3.1 CRISPR-Cas

O sistema *CRISPR-Cas* (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats -CRISPR associated proteins*) representa um conjunto de genes em *loci* específicos de *DNA* bacteriano que envolvem mecanismos que agem como sistema imunitário adaptativo de bactérias contra eventuais vírus bacteriófagos, tendo a capacidade de associar enzimas a fragmentos de RNA que irão atuar como guias para que tais enzimas (endonucleases denominadas *CRISPR associated proteins* ou *Cas*) sejam dirigidas a regiões específicas do *DNA* da bactéria, em que um fragmento de *DNA* exógeno está incorporado (SANTOS, 2017).

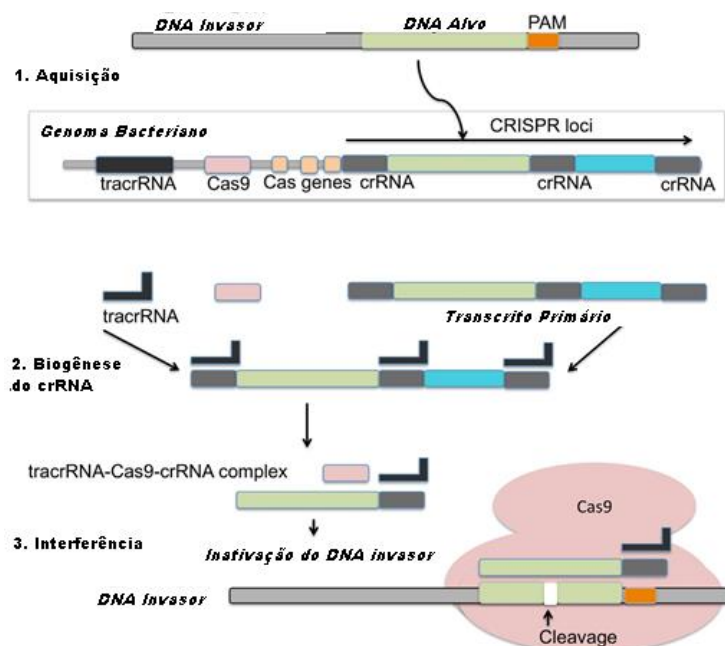
O sistema tem sua ação efetivada por endonucleases guiadas por moléculas de RNA. Tais moléculas são *crRNA* (*CRISPR RNA*) e *tracrRNA* (*tracer RNA*) complexadas, formando um *sgRNA* (single guide RNA) que se complexam com as endonucleases (proteínas *Cas*). O *crRNA*, *tracrRNA* e as enzimas *Cas* são provenientes dos *loci CRISPR* presentes no genoma da célula bacteriana. Cada *crRNA* será composto de uma região de repetidores/espaçadores e uma região que corresponde ao *DNA* exógeno (invasor), enquanto que os *tracrRNA* são provenientes de regiões adjacentes a região de repetições/espaçadores, como ilustrado na **Figura 9**, e são responsáveis por auxiliar no pós-processamento dos transcritos primários (AREND, 2017; SANTOS, 2017; VALLETTA, 2015; GARCÍA-TUNÓN, 2017).

Dependendo do mecanismo utilizado para realizar o processo de interferência, o sistema *CRISPR-Cas* pode ser classificado em classes, sendo que a classe 1 utiliza mais de uma proteína ou complexos proteicos e a classe 2 utiliza apenas uma enzima para realizar a aquisição do gene exógeno (MIR et al, 2017).

Dentro da classe 2, o sistema pode ser classificado em três tipos (I, II, III) e subtipos dentro desses tipos, que mudam de acordo com peculiaridades relacionadas às enzimas *Cas* envolvidas no processo de reconhecimento do *DNA* exógeno, síntese da molécula de *RNA* guia e clivagem do *DNA* após um segundo contato com o *DNA* exógeno. O tipo mais estudado dentro da classe 2 (que utiliza apenas uma enzima) é o tipo II, em que a enzima *Cas9* é responsável pelo processo de aquisição do *DNA* exógeno (AREND, 2017; SANTOS, 2017; MIR et al, 2017).

### 4.3.2 O Sistema *CRISPR-Cas*

Figura 9: Sistema *CRISPR-Cas9* em bactérias



Fonte: Adaptado de (ARORA; NARULA, 2017)

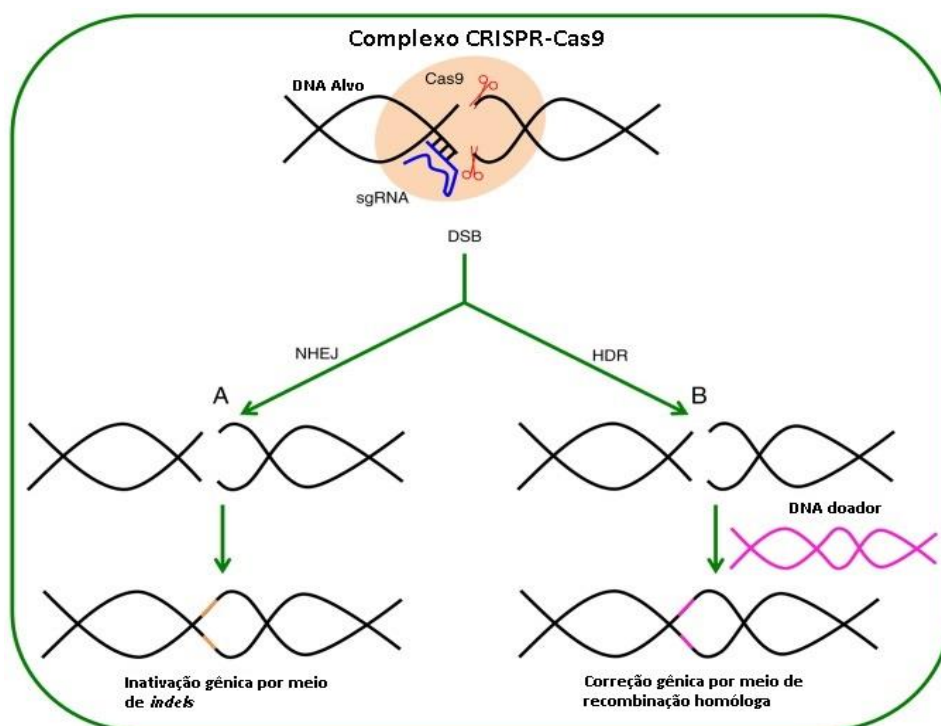
No genoma bacteriano o sistema *CRISPR-Cas9* tem a função de sistema imunitário adaptativo por meio dos transcritos provenientes dos *loci CRISPR* distribuídos pelo mesmo, composto de genes das endonucleases Cas, *tracrRNA*, regiões repetitivas que atuam como promotores de transcrição e espaçadores onde o *DNA* exógeno é incorporado. Para exercer função imunitária adaptativa, o sistema executa três etapas: 1) Aquisição do *DNA* exógeno, que envolve clivagem do *DNA* exógeno por meio de uma Cas9 em uma região próxima a um *PAM* (Protospacer Adjacent Motif) e incorporação deste fragmento nas regiões espaçadoras do *loci CRISPR*. 2) Biogênese do *crRNA* a partir do processamento pós-transcricional do transcrito primário, formando um complexo *crRNA-tracrRNA-Cas9*. 3) Interferência do processo de infecção viral por meio de clivagem do *DNA* exógeno incorporado ao *DNA* da célula bacteriana, em regiões que contém complementariedade ao fragmento presente no *crRNA-tracrRNA* (*sgRNA* ou *single guide RNA*).

Ao ser aplicado em modelos de células de mamíferos, o sistema *CRISPR-Cas* utiliza da capacidade da enzima Cas9 (ou variantes desta) de realizar excisão, seguido dos mecanismos de reparo da própria célula, para que seja realizada a reconstrução daquela região.

A excisão promovida pelo complexo *CRISPR-Cas9* convencional é capaz de causar uma *DSB* (*Double-strand break*). A célula é capaz de promover reparo do *DNA* mediante tais danos, utilizando mecanismos conhecidos como *non-homologous end-joining* (*NHEJ*) e *Homology-directed Repair* (*HDR*), elucidados na **Figura 10**. Tais mecanismos utilizam sistemas de leitura e correção do *DNA*, por meio de enzimas capazes de identificar erros na molécula. *NHEJ* ocorre quando o reparo se baseia na

excisão de parte dos nucleotídeos em torno do ponto de quebra e unir as extremidades dos fragmentos remanescentes. *HDR*, por outro lado, ocorre quando é utilizado um fragmento, homólogo nas regiões adjacentes ao ponto de quebra, para servir de molde para o fragmento que foi danificado ou editado. Pesquisas que utilizam edição por meio de nucleases *Cas* para promover *knockout* (*KO*) gênico, por exemplo, focam em promover *NHEJ*, pois os erros provenientes do mecanismo de reparo tendem a inviabilizar a transcrição do gene.

**Figura 10: Vias de reparo mediante excisão promovida pela enzima *Cas9***

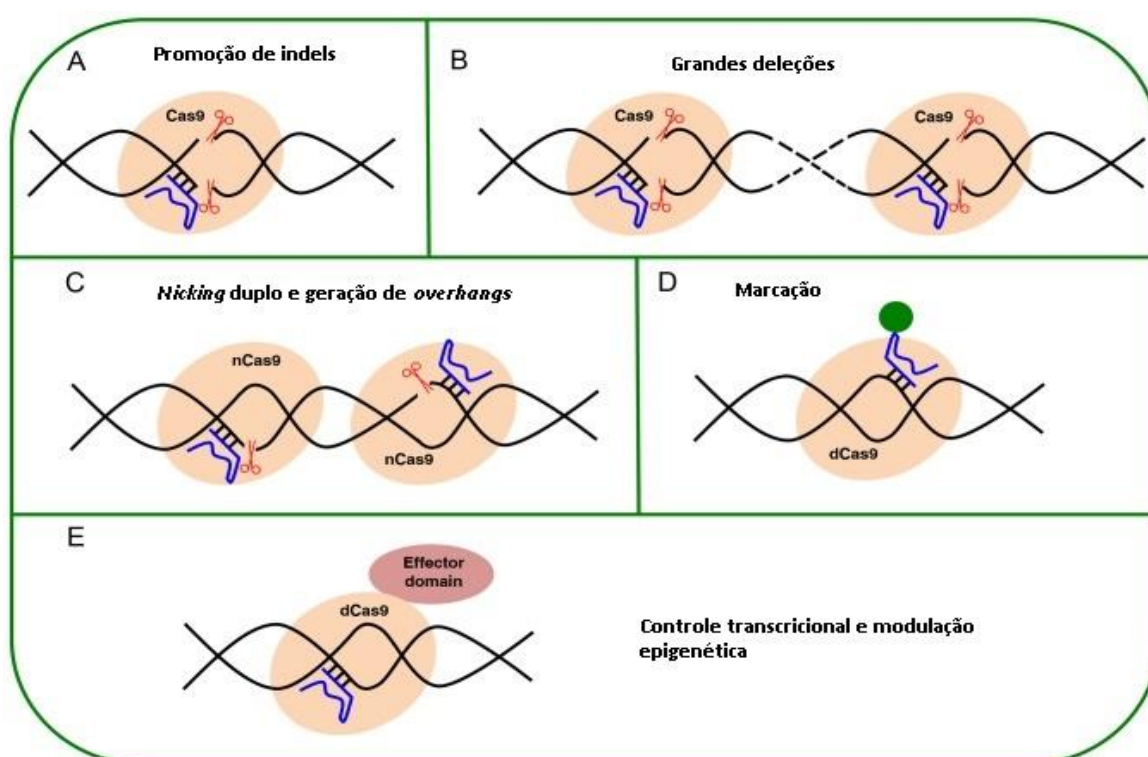


**Fonte:** Adaptado de (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2019)

Mediante excisão promovida pelo complexo *CRISPR-Cas9*, uma *DSB* (*Double-strand Breaks*) que poderá ser reparada por duas vias diferentes de reparo do *DNA*. O *NHEJ* (*Non-homologous end-joining*) se baseia na união das extremidades de ambas as cadeias do *DNA*. Usualmente, tal reparo é desejável quando se tem o objetivo de inativar um gene, pois os mecanismos de *NHEJ* envolvem complexos enzimáticos que podem aleatoriamente remover e adicionar bases nitrogenadas na região de reparo. A outra forma de reparo é a *HDR* (*Homologous directed repair*). Tal reparo ocorre quando os complexos enzimáticos responsáveis pelo reparo utilizam uma sequência modelo para realizar a polimerização da fita danificada. No âmbito da pesquisa com *CRISPR-Cas*, técnicas diferentes podem ser utilizadas para induzir ao reparo guiado por homologia, como utilizar variantes da enzima *Cas9*, como *Cas nickases* e promover, no momento da reação, um *DNA* doador, contendo, por exemplo, o ponto de mutação de interesse corrigido.

Além disso, é possível também utilizar diferentes tipos de enzima *Cas* para promover a edição, como indicado na **Figura 11**. Com o aprofundamento no conhecimento da estrutura da enzima *Cas9*, tornou-se possível realizar a edição gênica desta proteína, com o objetivo dar a mesma diferentes funções. Tais edições na enzima *Cas* permitem que ensaios que utilizem da enzima vão além da edição gênica convencional, como modulação transcricional de genes. É possível utilizar variantes da enzima sem a atividade catalítica, acoplando a ela efetores de transcrição ou fluorocromos marcadores.

**Figura 11: Variantes da Enzima *Cas* e seus mecanismos de ação**



**Fonte:** Adaptado de (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2019)

A- Uso de *Cas9* convencional, com apenas um *sgRNA*, promove uma excisão, que é reparada pelo maquinário celular e tende a gerar *indels*. B- Uso de dois *sgRNA*'s em regiões flanqueadoras pode promover, no genoma, uma deleção em larga escala. C- Uso de variante *nickase* da enzima *Cas*, que promove *SSB*'s ao invés de *DSB*'s. O uso desta variante da enzima *Cas* favorece o reparo guiado por homologia. D- *dCas9* (*dead Cas9*) é uma variante desta enzima sem a atividade endonuclease, pode ser utilizada para vários métodos, como marcação de genes ou modulação de fenômenos transcricionais. E- *dCas9* associada a um domínio efetor, que atua como fator transcricional. Ao se associar a um gene, este complexo *dCas9*/Domínio efetor pode modular os eventos de transcrição envolvendo o gene alvo do *sgRNA*.

No momento, a técnica e variantes já estão sendo utilizadas em agricultura e em pesquisas *in vitro* para o tratamento de doenças humanas, transitando entre diferentes tipos de condições patológicas, como no tratamento de doenças virais, oncológicas, cardiovasculares, obesidade, distrofias musculares, neurológicas, respiratórias, de pele e hematológicas (MOLLANOORI, 2018; FRANCO-TORMO et al., 2018).

Estratégias estão sendo utilizadas para tratar a doença falciforme ao promover correção da mutação que leva a troca de aminoácidos característica da doença (DEVER, 2016). Também existem três estratégias nas quais o *CRISPR* pode ser aplicado para terapia de doenças oncológicas, sendo elas: o uso em modulação imunoterápica (para formar células *CAR-T*, por exemplo), em genoma e epigenoma de células cancerosas e na modulação de fatores de virulência associados a oncogênese em infecções virais (MOLLANOORI, 2018).

O sistema *CRISPR-Cas9* em pesquisa em doenças neurodegenerativas já ocorre, no caso da DA e da DH, em estudos que aferem a possibilidade de reduzir as consequências cognitivas e motoras dos processos patológicos utilizando da mecânica de edição gênica provida pelo mecanismo molecular dado pelo sistema *CRISPR/Cas9* (ZHANG, 2016; DABROWSKA et al., 2018; SUN et al., 2018).

#### **4.3.3 *CRISPR-Cas* aplicado a pesquisa de doenças neurodegenerativas**

Inicialmente, a terapia gênica vem sendo aplicada em doenças neurodegenerativas por meio de técnicas que utilizam de vetores e mecanismos de alteração gênica provenientes de vírus para realizar silenciamento gênico ou imunoterapia aplicada às doenças de Parkinson, Alzheimer, ataxia espinocerebelar e esclerose lateral amiotrófica (DEVERMAN et al., 2018).

Certas doenças neurodegenerativas, porém, representam desafios na aplicação de terapias gênicas, visto que a causalidade pode variar dependendo do tipo de mutação ao processo patológico, como é indicado por Rohn e colaboradores (2018). Nesta pesquisa, foram analisadas as possibilidades de aplicação de técnicas envolvendo *CRISPR-Cas9* e *Donor DNA's* (*DNA* doador) na doença de Alzheimer. Apesar de reconhecerem que o sistema pode editar, essencialmente, qualquer gene relacionado com mutações autossômicas que podem levar a DAIP ou que possam

agravar as consequências da doença de Alzheimer de início tardio, o uso de Vetores Virais carregando plasmídeos de expressão ainda é mais popularizado como uma possível alternativa terapêutica em pesquisa, tendo em vista barreiras nas técnicas que utilizam de *CRISPR*, dadas as edições errôneas (*off-targeting*) que usualmente ocorrem em ensaios com *CRISPR-Cas* (ZHANG et al., 2015; Rohn et al, 2018).

Por outro lado, técnicas que envolvam silenciamento gênico devem ser utilizadas com cuidado em qualquer doença neurodegenerativa, pois em certos casos, como na APP da DA e na huntingtina da DH, ambas as proteínas têm funções fisiológicas, apesar de não completamente elucidadas. No caso da HTT, estudo feito por Chen et al., (2005) sugere que a inativação do gene da HTT promove morte precoce de neurônios em cérebros murinos adultos, indicando que a inativação da mesma pode não ser recomendada (KOLLI et al., 2018).

Pensando por outro lado, a aplicabilidade do sistema *CRISPR-Cas* se torna evidente, dada a capacidade, não só de silenciar genes, mas de manipular os genes em regiões específicas para que as proteínas resultantes sejam diferentes daquelas que condicionam processos patológicos.

#### 4.3.4 Aplicação de *CRISPR-Cas* no âmbito da pesquisa em Doença de Huntington

Foram analisados, neste trabalho, 6 artigos que utilizam da técnica *CRISPR-Cas* como foco de pesquisa em terapia gênica para a DH.

**Quadro 1: Relação dos artigos que pesquisam Doença de Huntington, com foco no alvo dos *sgRNA* e os resultados obtidos por cada artigo**

ARTIGO	ALVO NO DNA	RESULTADO
<b>1 - Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9 (2016)</b>	<b>Em fibroblastos de pacientes com DH,</b> excisão do Gene HTT em haplotipos epidemiologicamente relevantes, utilizando de <i>SNP's</i> que gerem <i>PAM's</i> e que só ocorrem em haplotipos mutantes.	100% de recuperação de haplotipos mutantes recuperados com a edição bem-sucedida.
<b>2 - Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases (2018)</b>	<b>Em fibroblastos de pacientes com DH com diferentes quantidades de repetições CAG,</b> utilizando pares de <i>nickases</i> que geram <i>SSB's</i> ( <i>Single-strand Breaks</i> ), removeram parte das repetições.	Redução do tamanho das repetições CAG, sem a diminuição da expressão de proteínas com números normais de repetições de glutamina.

<b>3 - CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease (2017)</b>	<b>Em Modelos murinos de DH</b> , utilizando de <i>CRISPR-Cas9</i> para 4 regiões flangeadoras do trato CAG e excisão completa do mesmo.	Redução da neurotoxicidade e aumento da capacidade motora analisado por imunohistologia e testes de capacitação motora.
<b>4 - CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington's Disease (2017)</b>	<b>Em Células-tronco mesenquimais de modelos murinos de DH</b> , utilizaram como alvo a região 5'UTR do éxon 1 do gene HTT, para cessar a produção da proteína.	Máximo de 79% e mínimo de 58% de redução na produção da HTT mutante, usando <i>NHEJ</i> . O artigo não informa as consequências da remoção completa do gene em neurônios.
<b>5 - Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells (2017)</b>	<b>Em hiPSC's (Human Induced Pluripotent Stem-Cells) de pacientes com DH</b> , ocorreu a remoção, por meio de <i>nickases</i> , do códon de início do gene HTT, seguido por HEJ promovido por transposons (estratégia "Piggy-Bac").	Correção e filtragem de células corrigidas, seguida de diferenciação das células para neurônios sinapticamente estáveis e funcionais.
<b>6 - CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo (2017)</b>	<b>Em fibroblastos de pacientes e modelos murinos com DH</b> , promovem a remoção do gene HTT mutante em casos de heterozigose, visto que apenas PAM's de alelos mutantes são alvo dos <i>sgRNA's</i>	Razão de expressão HTT mutante/HTT normal tende a expressão de HTT normal e redução de 40% da HTT mutante em hemisférios cerebrais de modelos murinos tratados.

**Fonte:** (SHIN et al., 2016; DABROWSKA et al., 2018; YANG et al., 2017; KOLLI et al., 2017; XU et al., 2017; MONTEYS et al., 2017).

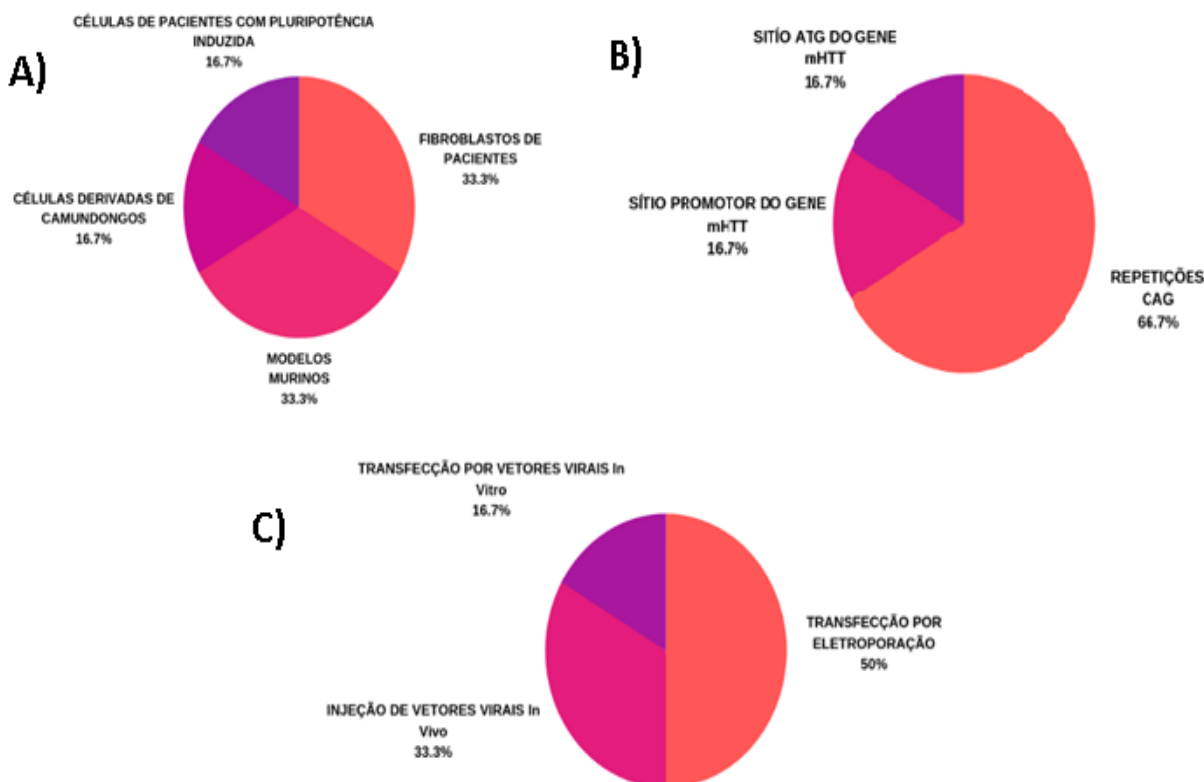
Os trabalhos que pesquisam a aplicabilidade de *CRISPR/Cas* em DH tem como foco principal a remoção/silenciamento da variação mutante da proteína HTT. Ao remover a porção do motivo de repetição CAG, ou até mesmo silenciar o gene, os pesquisadores aferiram, entre outros fenômenos, cessamento da produção de HTT mutante, diminuição macroscópica dos aglomerados formados pela HTT mutante e, também, aumento das capacidades motoras de modelos murinos afetados pela doença (SHIN et al., 2016; DABROWSKA et al., 2018; YANG et al., 2017; KOLLI et al., 2017; XU et al., 2017; MONTEYS et al., 2017).

Em relação a metodologia podemos perceber certos padrões de escolha, principalmente no que se diz respeito a escolha do método de edição (qual tipo de enzima *Cas9* ou *sgRNA*), qual a região gênica que será alvo da edição e o método utilizado como vetor para a entrega de tais elementos gênicos para as células ou modelos murinos. Na **Figura 12** está sintetizada a relação, entre os artigos, destas escolhas de metodologia.

Dentre as escolhas de metodologia é perceptível que o modelo experimental foi o mais variado, possivelmente porque a otimização do protocolo para promover as

maiores alterações fenotípicas dependem do modelo estudado. O gene alvo foi apenas um, o gene HTT. Apesar disso, regiões diferentes do gene foram escolhidas pelos estudos realizados.

**Figura 12: Distribuição dos artigos nos quesitos de Objetos de Estudo (A), Gene Alvo (B) e Método de Transferência (C).**



**Fonte:** (SHIN et al., 2016; DABROWSKA et al., 2018; YANG et al., 2017; KOLLI et al., 2017; XU et al., 2017; MONTEYS et al., 2017).

- A- A escolha do objeto de estudo ou modelo de estudo foi o dado mais variado dentre os artigos. Dois dos estudos usaram fibroblastos extraídos de pacientes com DH e outros dois utilizaram modelos murinos *in vivo*. A escolha do objeto de estudo, neste caso, confere ao trabalho mais ênfase nas características fenotípicas cuja edição da para o modelo.
- B- Para a DH, há um consenso no alvo de edição, pois a doença é causada por um tipo de mutação em apenas um gene, gerando o gene HTT mutante (mHTT). Por isso, 4 dos 6 artigos escolheram, diretamente, encurtar o tamanho da cauda de CAG do mHTT. Por mais que os outros dois artigos focaram em diferentes regiões, ainda assim o foco é diminuir ou, até mesmo, cessar a produção da HTT mutante.
- C- O método de transferência dos elementos gênicos irá depender, principalmente, do modelo de estudo. Para modelos murinos, faz-se necessária a injeção direta de vetores (neste caso, vetores virais) para a entrega do material gênico nas células de interesse. Os vetores virais foram utilizados, também, para realizar a entrega do material em células *In vitro*, apesar de que técnicas de eletroporação são mais viáveis para realizar integração de plasmídeos a estes modelos, como evidenciado por 3, dos 6 estudos.

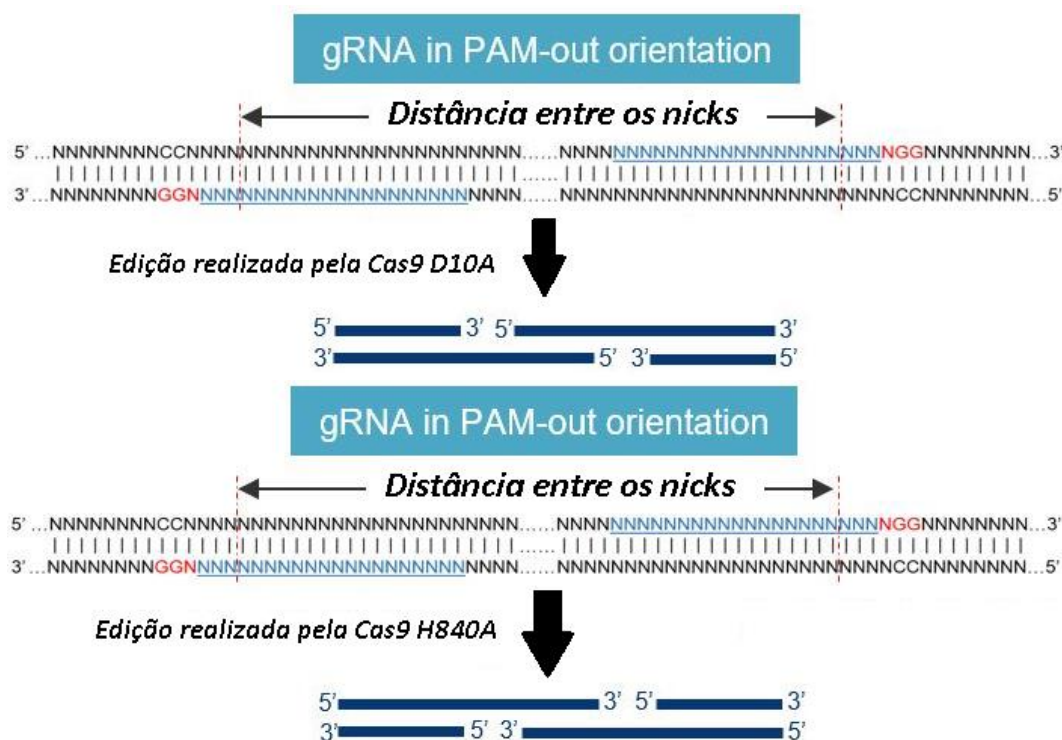
Um outro fator que foi relevante nos artigos foi a estratégia utilizada pelas pesquisas, para realizar, de fato, as edições. Apesar de todos utilizarem a atividade endonuclease da Enzima Cas9, a forma como estes cortes foram realizados pode dar a edição efeitos diferentes. Por exemplo, artigos como os de DABROWSKA et al., 2018 e XU et al., 2017 (Artigos 2 e 5 do **Quadro 1**, respectivamente) escolhem utilizar uma variação de *nickase* da enzima Cas9 adquirida ao alterar a sequência de DNA codificante, de forma a silenciar a porção que dá a atividade catalítica aos domínios *RuvC* ou *HNH*, responsáveis por realizar as quebras-duplas de cadeia. Ao silenciar um destes domínios, gera-se uma enzima *nickase*, capaz de gerar quebras de fita-única (*SSB's* ou *Single-strand Breaks*) (CONG et al., 2013).

A escolha de usar uma versão de *nickase*, cujo mecanismo é demonstrado na **Figura 13**, vem de estudos como o realizado por Ran et al. (2013), que descreveram o uso de dois *sgRNA's* associados a *Cas Nickases*. Em tal estudo, os pesquisadores aferiram que usar a dupla de *Cas Nickases*, em contraste a usar a Cas9 convencional, aumenta a especificidade de edição (redução de *off-targeting*) em até 1000 vezes.

A produção de uma variante da enzima Cas tem como princípio a edição dos domínios desta proteína (domínio catalíticos) conhecidos como *RuvC* e *HNH*. Ao promover silenciamento de um destes domínios, a enzima perde a capacidade de promover excisão em ambas as fitas, pois o *DSB* é promovido por ambos os domínios simultaneamente.

Uma observação relevante é que os artigos que utilizaram da técnica baseada em *nickases* para promover a edição, realizaram testes de detecção de *off-targeting* baseados em softwares como *CRISPOR* ou técnicas como o *Surveyor assay*, e não encontraram nenhuma mutação fora dos locais de alvo dos *sgRNA's*. Por outro lado, dois dos trabalhos que usaram a Cas9 convencional, como os artigos de YANG et al., 2017 e MONTEYS et al., 2017 (artigos 3 e 6 do **Quadro 1**, respectivamente), puderam identificar efeitos de *off-targeting* dados pela ação da enzima.

**Figura 13: Diagrama demonstrando a ação de duas variações da enzima *Cas Nickase* ao realizar os *Single-strand Breaks*.**



**Fonte:** Adaptado de (WANG *et al.*, 2018)

Neste caso, usa-se dois *sgRNA*'s para circundar uma região gênica de interesse. No primeiro exemplo, a enzima *Cas9 D10A*, que contém o domínio RuvC mutado e, portanto, só realiza as clivagens na fita alvo (fita complementar ao *sgRNA*). No segundo exemplo, usa-se a *Cas9 H840A*, que tem o domínio HNH mutado e, portanto, só realiza a clivagem na fita não-alvo (fita que contém o PAM). O tipo de enzima utilizada altera os *overhangs* formados e, por isso, pode alterar os fenômenos de reparo guiado por homologia.

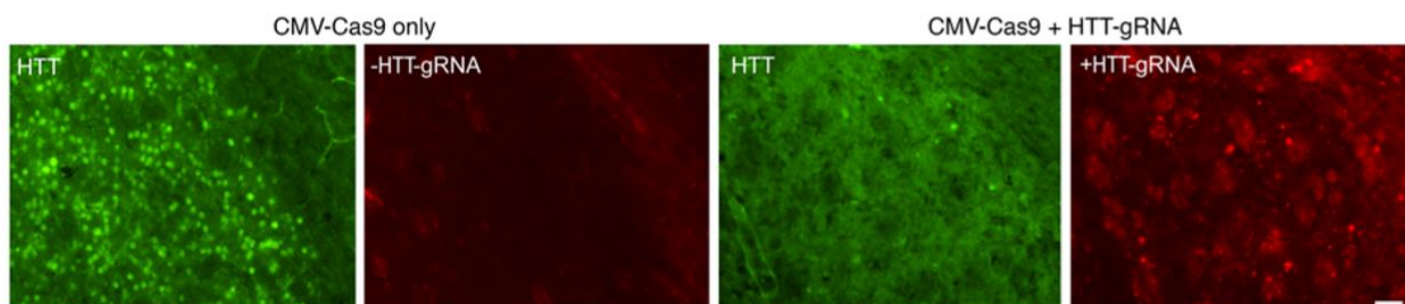
Além do uso de *nickases* para favorecer o reparo guiado por homologia, alguns utilizaram apenas modelos heterozigotos cujos haplotipos continham, no gene *HTT*, a formação de PAM's que permitissem apenas a clivagem do alelo mutante e não do alelo saudável. Tal diferenciação é importante porque, apesar de pouco estudada, sabe-se que a *HTT* saudável promove funções como o crescimento axonal e desenvolvimento neuronal.

Em relação a metodologia, é perceptível o número de combinações possíveis para realizar testes de edição gênica. Algumas escolhas se apresentam como mais viáveis quando se pensa na terapia gênica da DH. O uso, por exemplo, de métodos que visem 1) reduzir o número de edições off-target utilizando *nickases* e ensaios preditivos, 2) promover a edição apenas de alelos mutantes, utilizando de PAM's que ocorrem em haplotipos mutantes e 3) promover maior fidelidade de edição ao induzir

reparo guiado por homologia, se mostraram, nestes estudos, como as escolhas mais eficientes para as estratégias de edição.

Quanto aos resultados, todos os artigos apresentaram sucesso no processo de clivagem, por si só, do *DNA*. Alguns artigos, além de demonstrarem as taxas de recuperação de clones tratados, ou o sequenciamento da região de clivagem pós-tratamento (presente em todos os artigos) realizaram, ainda, implicações fenotípicas dos efeitos da aplicação da técnica. Um exemplo dentre estes é o artigo 3, que utilizou pares de *sgRNA*'s para realizar a clivagem em modelos murinos. A avaliação dos camundongos mostrou recuperação das capacidades motoras após o tratamento, além disso, cortes histológicos realizados a partir do encéfalo dos modelos animais, corados por reagentes imunofluorescentes, demonstraram diminuição considerável dos níveis de HTT mutante, como evidenciado na **Figura 14**.

**Figura 14: Dois ensaios de imunofluorescência para aferir a depleção da produção de APP nas células tratadas, em relação as não-tratadas.**



**Fonte:** Adaptado de (YANG *et al.*, 2017)

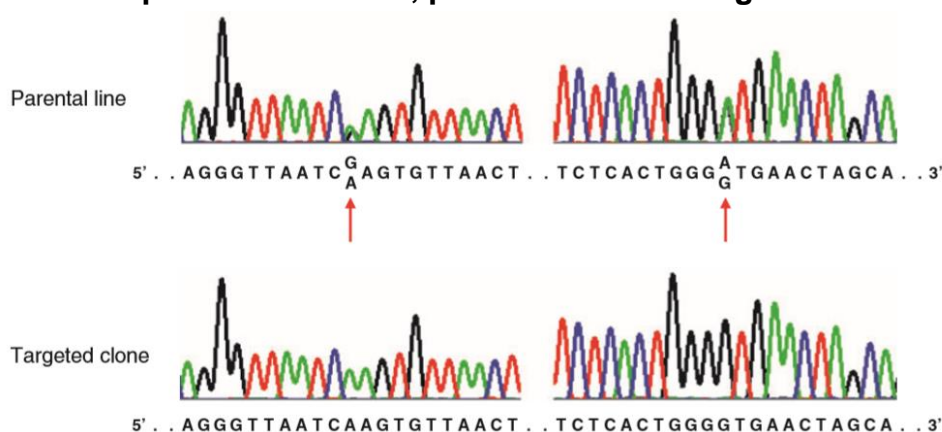
Na esquerda, um ensaio controle utilizando apenas a enzima *Cas9* (células não-tratadas), demonstra a HTT mutante, marcada por verde fluorescente e o controle negativo, marcando o gRNA, não presente neste ensaio. A direita, no ensaio utilizando a enzima e o RNA guia, é evidenciada a redução dos pontos de fluorescência referentes a HTT mutante e a marcação do gRNA. Em comparação dos dois ensaios, a redução da produção da HTT indica sucesso no processo depleção dos níveis da proteína mutante.

Na pesquisa realizada por XU *et al.*, 2017 (**Artigo 5 do Quadro 1**), utilizaram a técnica de *nickases* e *piggy-bac* para promover reparo guiado por homologia, além de realizarem técnicas de imunofluorescência nas células editadas, notaram que, mediante tratamento, as células neuronais tinham sua excitabilidade recuperada. Tal fenômeno pode ser uma consequência da depleção dos níveis de HTT mutante

presente nestas células. Outros fenômenos, como recuperação da reatividade a fatores de crescimento e atividade mitocondrial também foram reportados.

Ambos os artigos que aplicaram a técnica focando em modelos heterozigotos, para excisão apenas da mutação no alelo mutante foram bem-sucedidos. Comprovando, por meio de regiões de monitoramento, presentes em ambos os alelos, mas que foram excisadas do alelo mutante, técnica utilizada para garantir que a excisão ocorreu apenas no alelo mutante, como mostra a **Figura 15**.

**Figura 15: Sequenciamento de dois clones antes e depois da excisão promovida por *CRISPR-Cas9*, provenientes do artigo 1.**



**Fonte:** Adaptado de (SHIN et al., 2016)

Nota-se que, nas linhagens parentais, antes do tratamento, existe um ponto de sobreposição de dois nucleotídeos diferentes (A e G). Isso ocorre porque tais células são heterozigotas e, no alelo mutante, existe um SNP que se encontra na região de clivagem da enzima Cas9. Nos clones alvo (linha inferior), fica evidente a ausência deste ponto de heterozigose, pois o alelo mutante foi removido, em ambos os casos.

#### 4.3.5 Aplicação de *CRISPR-Cas* no âmbito da pesquisa em Doença de Alzheimer

Foram analisados, neste trabalho, 4 artigos que utilizaram do sistema *CRISPR/Cas* com foco em terapia gênica para DA.

**Quadro 2: Relação dos artigos que pesquisam Doença de Alzheimer, com foco no alvo do *sgRNA* e os resultados obtidos por cada artigo**

ARTIGO	ALVO NO DNA	RESULTADO
1 - <i>CRISPR/Cas9 Mediated Disruption of the Swedish APP Allele as a Therapeutic Approach for Early-Onset Alzheimer's Disease</i>	Em fibroblastos e neurônios de modelos murinos heterozigotos para o alelo mutante <i>Swedish</i> , foi alvejada apenas a remoção dos genes mutantes, utilizando de PAM que ocorre adjacente ao ponto de mutação, preservando o gene normal.	Foi observada uma redução de 60% dos níveis de fragmentos A $\beta$ produzidos nas linhagens editadas, sem alteração do alelo WT e, portanto, sem diminuição da produção de APP.

<p><b>2 - CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2N141I neurons (2017)</b></p>	<p><b>Em células pluripotentes derivadas de pacientes heterozigotos com mutações para a PSEN2</b>, foi utilizado um <i>sgRNA</i> específico para o alelo mutante (N141I) e um oligo nucleotídeo de fita-simples para servir de modelo para reparo guiado por homologia.</p>	<p>Tanto a razão A<math>\beta</math>42/A<math>\beta</math>40 aumentada, quanto a excitabilidade diminuída de neurônios mutados, foram revertidos mediante correção por <i>CRISPR/Cas</i> e reparo guiado por homologia</p>
<p><b>3 - A CRISPR/Cas9 based strategy to manipulate the Alzheimer's amyloid pathway (2018)</b></p>	<p><b>Em modelos murinos WT, células derivadas de pacientes e células de modelos murinos</b>, foi clivada a região que codifica para a porção C-terminal da APP, com o objetivo de truncar esta porção da proteína.</p>	<p>O ato de truncar a porção C-terminal da APP diminuiu a ação da <math>\beta</math>-secretase e aumentou a ação da <math>\alpha</math>-secretase, dando a esta edição um caráter neuroprotetor, em todos os modelos estudados.</p>
<p><b>4 - Generation of a gene-corrected isogenic control hiPSC line derived from a familial Alzheimer's disease patient carrying a L150P mutation in presenilin 1 (2016)</b></p>	<p><b>Em células derivadas de um paciente contendo uma mutação pontual no gene da PSEN1</b>, foi clivada a região da mutação pontual e um oligo nucleotídeo doador com a sequência corrigida serviu para o reparo guiado por homologia.</p>	<p>Foi possível, a partir da técnica de edição, reverter a mutação pontual que ocorre naquela linhagem celular.</p>

**Fonte:** (GYÖRGY et al., 2018; ORTIZ-VIRUMBRALES et al., 2017; SUN et al., 2018; POON et al., 2016)

Para a aplicação de *CRISPR-Cas* na DA, ao contrário do que se realiza em DH, é mais improvável focar em apenas um gene. Isso ocorre porque a DA é uma doença multigênica e as mutações que causam a doença podem se encontrar em diferentes genes. Os trabalhos analisados nesta revisão, por exemplo, focam exclusivamente nas presenilinas e na APP, que fazem parte da hipótese amiloide do desenvolvimento da DA. Apesar disso, outros genes já foram associados ao desenvolvimento da DA (FRIDMAN et al., 2004).

Por serem apenas quatro artigos analisados, os métodos de aplicação não variam tanto quanto na DH. Em relação a metodologia dos artigos, temos que: ao contrário da doença de Huntington, os artigos que utilizaram o sistema com foco na DA não divergiram nas metodologias de excisão ou até mesmo nas estratégias. Isso ocorre, possivelmente, pelo fato de que a DA é uma doença multigênica, ou seja, as mutações causadoras (ou agravadoras) da doença ocorrem em genes diferentes, fazendo com que o foco seja a escolha do alvo e não o método de excisão. Todos os artigos utilizaram enzimas *Cas9* convencionais para promover *DSB's* (GYÖRGY et al., 2018; ORTIZ-VIRUMBRALES et al., 2017; POON et al., 2016).

Em alguns casos, como nos artigos de ORTIZ-VIRUMBRALES et al., 2017 e POON et al., 2016 (Artigos 2 e 4 do **QUADRO 2**) os *DSB's* foram gerados com o

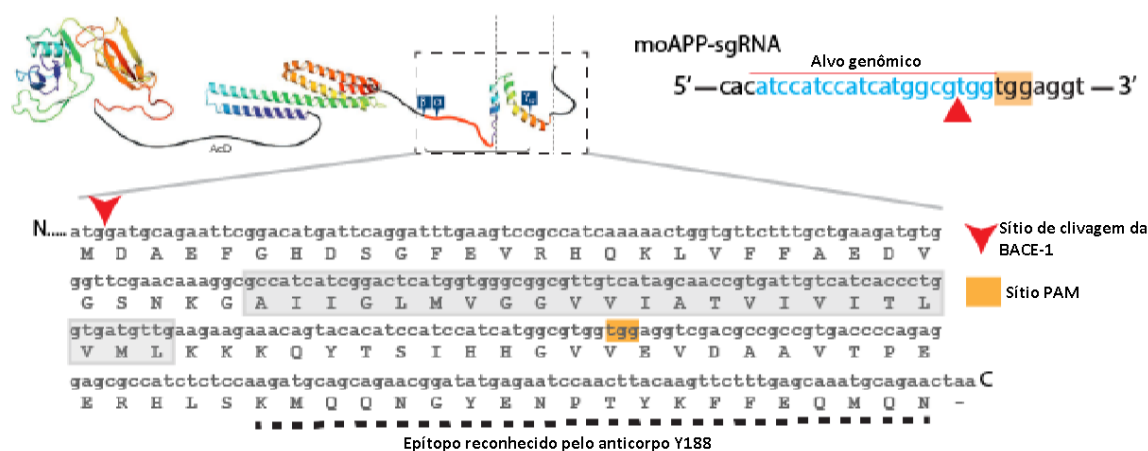
objetivo de promover o reparo guiado por homologia, a partir de uma sequência de DNA doadora, que contém a mutação corrigida. Já em outros casos, como no estudo de SUN et al., 2018 (Artigo 3 do **QUADRO 2**), os DSB's não foram gerados para corrigir uma mutação e sim para promover alterações conformacionais na proteína presente em camundongos WT (saudáveis) e células humanas com o gene APP normal.

Dos quatro artigos, existe destaque ao de SUN et al., 2018, pois neste trabalho o foco dos pesquisadores foi alterar, não as células mutantes, mas as células saudáveis provenientes de camundongos (WT) e humanos. O objetivo do trabalho foi de realizar edição gênica em pequenos fragmentos de proteínas que tem papel importante na patogenia de doenças.

No caso, uma porção gênica da APP, responsável por codificar a porção C-terminal da proteína, foi excisada. Mediante edição, os 36 aminoácidos finais da APP estavam truncados. Na presença de APP truncada, a quantidade de fragmentos A $\beta$  formados era menor e a quantidade de fragmentos A $\alpha$  era maior. Tal consequência da edição é importante, pois a promoção da ação da  $\alpha$ -secretase vem sendo considerada como neuroprotetora. Os autores hipotetizaram que ao truncar tal região da APP, a ação da  $\beta$ -secretase era prejudicada, pois a mesma era incapaz de se associar corretamente a proteína, enquanto a ação da  $\alpha$ -secretase era favorecida, fornecendo a edição um efeito neuroprotetor. Alguns ensaios promovidos no trabalho de SUN et al., 2018 podem ser consultados na **Figura 16** e na **Figura 17**.

A  $\beta$ -secretase era incapaz de se associar a APP pois, quando a APP está truncada, a região C-terminal não se encontra disponível para a atuação da  $\beta$ -secretase. Apesar disso, a APP ainda está disponível para ação da  $\alpha$ -secretase, aumentando a probabilidade da ação desta enzima sobre a APP. As hipóteses formuladas pelos autores foram: A) A incapacidade de formação do complexo  $\beta$ -secretase/APP se deu porque a APP foi incapaz de sofrer suas alterações pós-traducionais no complexo de golgi; B) A porção truncada da APP era responsável por sinalizar a internalização da proteína em vesículas momentaneamente, para que ela pudesse ser processada pela  $\beta$ -secretase.

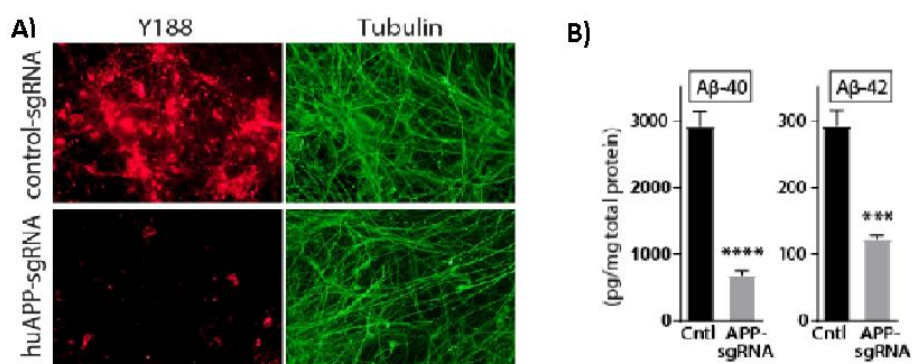
**Figura 16: Modelo da APP, região gênica de interesse e alvo do sgRNA no ensaio em modelos murinos *Wild-Type***



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

Utilizaram um modelo murino para aferir os efeitos da excisão na proteína. O *sgRNA* utilizado foi o moAPP-*sgRNA* para os modelos murinos e huAPP-*sgRNA* para as células humanas. O gene APP dos camundongos e humanos diferem por duas bases na porção *upstream* do PAM. O sítio PAM se localiza na região correspondente a porção C-terminal da proteína APP e está distante do sítio de clivagem da BACE-1, enzima necessária para iniciar o processo de  $\beta$ -clivagem. Foi utilizado como método de controle um anticorpo Y188, que se liga ao epítipo que corresponde a região clivada pelo *sgRNA* em questão.

**Figura 17: Ensaio realizado para demonstrar a eficiência de excisão e os níveis de fragmentos  $\beta$ -amilóides após a edição**



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

**A** – Como método de controle, células sofreram imunocoloração para indicar a afinidade dos anticorpos Y188 pela amostra. No caso na amostra controle, na presença de um *sgRNA* sem afinidade pelo gene APP, os anticorpos se mostram evidentes. O contrário é percebido nas amostras que contém o huAPP-*sgRNA*, que gera excisão na região que corresponde ao epítipo reconhecido pelo anticorpo Y188. **B** – As quantidades de fragmentos  $\beta$ -amilóides produzidos foram quantificadas.

As metodologias de aplicação da técnica na DA seguem o mesmo raciocínio. Por terem como foco a hipótese amiloide do desenvolvimento da DA, todos os trabalhos (com exceção do **artigo 4 do quadro 2**) aferem os níveis de produção dos fragmentos  $\beta$ -amilóides.

No caso do artigo de ORTIZ-VIRUMBRALES et al., 2017, um outro fenômeno foi evidenciado. Mediante a edição da mutação pontual da PSEN2, as células recuperavam a sua neuroexcitabilidade, a níveis semelhantes aos das células controle, indicando uma possível relação entre a mutação que ocorre na PSEN2 e os fenômenos de perda de excitabilidade presentes em casos de DAIP.

Fica claro que, no caso da DA, é mais difícil isolar apenas um gene para a reversão dos eventos patológicos da doença, pois a DA é uma doença multigênica, ao contrário da DH. Apesar disso, os estudos que aplicam as técnicas de edição na DA já são de grande importância para a bibliografia acima do tema, pois cada edição demonstra os efeitos presentes na ausência do gene editado. Tal observação vale para os estudos em ambas as doenças. Mediante edição gênica, por mais que o efeito terapêutico ou a reversão de fenótipo não seja observada, ou seja observada em níveis mínimos, continua sendo importante analisar os efeitos que a remoção daquele gene/proteína tem sobre os organismos estudados.

## 5 DISCUSSÃO

Como amplamente divulgado, as doenças neurodegenerativas aqui estudadas são inevitavelmente progressivas e incuráveis. Seu tratamento é apenas paliativo e, portanto, novas metodologias devem ser exploradas para atuar como medida terapêutica para estas condições. A Doença de Huntington (DH) é causada por mutações no gene da Huntingtina (HTT), que ao receber adições de trincas de CAG, é transcrita e traduzida em uma proteína anômala, que tem função atenuada e promove eventos de neurotoxicidade por diversos mecanismos diferentes. A DA, por outro lado, pode ser causada por deficiências genéticas, especialmente quando em seu subtipo de início precoce. As mutações que levam a Doença de Alzheimer de Início Precoce são variadas e podem afetar diferentes proteínas envolvidas em processos biológicos segregados (SERENIKI 2008; LANE et al., 2017).

Para ambas, a farmacoterapia atualmente disponível tem como foco o postergamento dos sintomas, utilizando de fármacos que manipulem vias intracelulares relevantes ao processo patológico. Por ser um tratamento apenas postergador, e não curativo, faz-se necessária a busca por novas metodologias terapêuticas.

Foi a partir da ideia de explorar as novas possibilidades em medidas terapêuticas, que o presente trabalho foi realizado, com o objetivo de analisar os trabalhos que apliquem o sistema *CRISPR-Cas* e suas variantes em modelos de Doença de Huntington (DH) e Doença de Alzheimer (DA), com a finalidade de promover medidas terapêuticas.

Diante dos resultados obtidos, identifica-se elementos das técnicas que estão sendo utilizadas pelos artigos que aplicam *CRISPR-Cas9* em modelos da DA e da DH, assim como comparar as diferenças de aplicação entre as duas doenças.

Foram analisados 10 artigos ao todo, sendo que 4 correspondem a edição gênica em modelos da DA e 6 em modelos da DH. É perceptível, a partir do número de estudos, que a DH atrai mais adeptos a aplicar técnicas de edição gênica em modelos de doenças neurodegenerativas, se comparada a DA, isso se dá, provavelmente, porque a DA é uma doença multigênica. No quesito de terapia gênica com o sistema *CRISPR-Cas9* e suas variantes, uma doença ser multigênica implica em certos desafios. Primeiramente, em grande parte dos casos, a remoção/edição de

apenas um fragmento gênico não seria o suficiente para promover uma medida terapêutica, tendo em vista que mais de um gene pode estar promovendo o estabelecimento do processo patológico. Outro fator a ser considerado é que, além da DA ser causada por mais de uma mutação em mais de 5 genes diferentes, a atuação de cada mutação no estabelecimento da doença ainda não é elucidada, tornando difícil a avaliação fenotípica dos efeitos que cada edição traz ao modelo editado.

Evidencia-se, ao analisar a aplicação do sistema *CRISPR-Cas* em modelos da DA, que os mesmos tendem a não focar em apenas um gene. Mesmo aqueles que focam em um gene, como no caso de dois artigos que realizaram edição da Proteína Precursora Amilóide (APP) realizam edições em porções diferentes do gene e com finalidades diferentes. Isso pode ser explicado pela bibliografia presente acima da doença, que indica que a doença de Alzheimer de início precoce pode ser causada por uma variedade de mutações em diferentes genes (CACACE; SLEEGERS; VAN BROECKHOVEN, 2016).

Enfatiza-se aqui que, além de serem poucos artigos que focam em genes diferentes, os trabalhos focam apenas em genes que codificam para proteínas presentes na hipótese da Cascata amiloidal. Tal hipótese é apenas uma, das outras cinco que foram formuladas para elucidar os acontecimentos que levam ao desenvolvimento da DAIP (BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017; GYÖRGY et al., 2018; SUN et al., 2018).

Para modelos da DH o foco da metodologia não foi o de escolher o gene alvo, mas o de otimização dos protocolos de edição, haja vista que o gene causador da doença de Huntington, assim como o tipo de mutação que leva ao estabelecimento da doença, já são amplamente reportados (BATES et al., 2015; PERKINS, 2017).

Ambos os grupos de artigos têm como foco na metodologia dos trabalhos evitar que o reparo, que segue a edição realizada pelo sistema *CRISPR-Cas*, seja não-homólogo. Possivelmente porque um reparo não-homólogo, como o *NHEJ* ou *non-homologous end-joining* parte do princípio de geração de pequenas *indels* (inserções e deleções aleatórias) em torno da região de edição. Tal estratégia poderia ser aplicada, em casos onde o foco é silenciar um gene por completo, mas quando o

objetivo é promover a remoção de uma mutação, tal metodologia permanece em segundo plano, como já reportado (LIU et al., 2019; WANG et al., 2018).

Para evitar tal mecanismo de reparo, os trabalhos aplicaram diferentes técnicas. A mais predominante foi a de prover as células um molde de *DNA*, que contém homologia com as regiões que flanqueiam o ponto de excisão, para aumentar a probabilidade de a célula utilizar do modelo para realizar reparo guiado por homologia. Uma outra forma de promover o reparo guiado por homologia foi o de utilizar uma variante *nickase* da *Cas9*, nomeada *Casn*. Esta variante realiza um *single-strand break (SSB)*, no lugar de um *double-strand break (DSB)*. Corrobora-se, pela bibliografia presente acima do tema, que ambas as técnicas aumentam a probabilidade de a via de reparo ser guiada por homologia (LIU et al., 2019; WANG et al., 2018; TREVINO; ZHANG, 2014).

A metodologias de entrega do material gênico seguiram padrões em ambos os grupos. Utilizando vetores virais para promover a inserção gênica em modelos murinos e técnicas de eletroporação para inserção de plasmídeos em modelos *in vitro*. O uso de vetores virais para entrega do material em modelos *in vivo* ainda é a mais utilizada, dada a capacidade que os vetores virais têm de reconhecer diferentes tipos celulares (XU et al., 2019)

Ressalta-se que, no âmbito da aplicação da edição gênica na DH, ocorreram discrepâncias entre o que foi reportado no artigo e a bibliografia básica acima do tema. No trabalho de KOLLI et al., 2017, reportam uma metodologia de excisão que envolve a remoção de duas porções do gene da Huntingtina (HTT), para promover silenciamento alelo-inespecífico do gene. No artigo, é argumentado que não existem dados e argumentos robustos o suficiente para indicar que o silenciamento do gene seja prejudicial ao sistema nervoso de indivíduos adultos. Apesar disso, SCHULTE; LITTLETON, 2011, reportam, em sua revisão, que a remoção do gene HTT em modelos da doença de Huntington afeta o desenvolvimento de cérebros adultos, tendo que a edição de indivíduos doentes deve ter como foco apenas o alelo mutante.

Apesar dos desafios apresentados na aplicação da técnica em doenças monogênicas e multigênicas, todos os artigos aqui apresentados foram capazes de realizar edições gênicas com alta precisão, em modelos variados de ambas as duas doenças. Tais resultados representam a possibilidade de aplicação futura do sistema

*CRISPR-Cas* como medida terapêutica para doenças neurodegenerativas, apesar de não estarem no mesmo cenário das técnicas que já são aplicadas em testes clínicos em humanos, como os utilizados para tratar cegueiras congênitas, beta-talassemias e certos tipos de câncer, como linfomas (RUAN et al., 2017; KHOSRAVI et al., 2019; ZHAO et al., 2017).

Ainda assim, a perspectiva dada pelo cenário atual é promissora, tendo como referência o aumento considerável no número de estudos que aferem a aplicabilidade do sistema em doenças humanas e, com sucesso, são capazes de reverter perfis fenotípicos e retomar funções biológicas normalizadas.

## 6 CONCLUSÃO

Doenças neurodegenerativas são condições patológicas de alto impacto na saúde dos acometidos, pois são de difícil diagnóstico definitivo, carregam sintomas incapacitantes, são incuráveis e inevitavelmente progressivas. Esforços são realizados, por parte da comunidade científica, para elucidar os mecanismos fisiopatogênicos que levam ao estabelecimento destes processos patológicos.

A doença de Alzheimer (DA) e a doença de Huntington (DH) são exemplos destas condições. Ambas são causadas por neurodegeneração, inicialmente em porções diferentes do cérebro e que, ao fim, tendem a causar perda de capacidades motoras e cognitivas.

Para ambas, a farmacoterapia atualmente disponível tem como foco o postergamento dos sintomas, utilizando de fármacos que manipulem vias intracelulares relevantes ao processo patológico. Por ser um tratamento apenas postergador, e não curativo, faz-se necessária a busca por novas metodologias terapêuticas.

A terapia gênica por intermédio do sistema *CRISPR-Cas9* é uma das possibilidades de uso no campo da terapia gênica. Apresenta vantagens como a relativa facilidade em promover ensaios de edição gênica com precisão de até um par-de-bases.

Foram analisados 10 artigos ao todo, sendo que 4 correspondem a edição gênica em modelos da DA e 6 em modelos da DH. As técnicas de edição aplicadas a Doença de Alzheimer de Início Precoce (DAIP) apresentaram intenção de elucidar quais os genes alvo seriam de maior eficácia para reverter os perfis fenotípicos da doença. Os que aplicaram a edição em DH tiveram como foco otimizar os protocolos de edição, para promover a maior eficácia de edição em apenas um gene alvo.

Apesar disto, alguns trabalhos se destacam por promover edições que vão além da remoção de mutações para promover reversão fenotípica. Um exemplo destes trabalhos focou em promover alterações na proteína precursora amilóide saudável, com a intenção de promover uma variante da proteína incapaz de

estabelecer o processo patológico da DA, de acordo com a hipótese da Cascata amiloidal.

Artigos que aplicaram o sistema *CRISPR-Cas9* na DH focaram em otimizar a metodologia utilizada para promover a edição mais eficiente possível. Diferentemente dos artigos acima da DA, os que trataram da DH utilizaram de metodologias diferenciadas, como o uso de variantes de *CRISPR-Cas*. Para os artigos que trataram da DH em modelos *in vivo*, a análise da capacidade motora dos camundongos foi evidenciada, além disso, em modelos *in vitro*, houve a análise da recuperação bem-sucedida das capacidades eletrofisiológicas dos neurônios.

Em comparação da aplicabilidade do sistema *CRISPR-Cas* entre a DA e a DH, tem-se que o uso da edição gênica em uma doença monogênica (causada por mutações em apenas um gene) é facilitado, quando comparada a uma doença multigênica (causada por múltiplas mutações e múltiplos genes). Não só pelo fato de que uma doença multigênica tem mais fatores a serem editados, mas sim porque antes de serem editados, tais genes devem ser profundamente estudados, para que seja possível ponderar a relevância fisiológica deste gene, com os riscos de promover uma edição gênica no mesmo e os benefícios que tal edição trará ao modelo tratado.

Analisando o cenário atual da aplicabilidade do sistema *CRISPR-Cas* para promoção de medidas terapêuticas em doenças neurodegenerativas, em específico a DA e a DH, pode-se concluir que é possível promover edições de alta eficiência em ambas as doenças, mas não necessariamente tal edição é acompanhada de alterações fenotípicas relevantes o suficiente para promoção de efeito terapêutico. Por outro lado, técnicas de edição que obtiveram bons resultados de reversão fenotípica (mais frequentes nas pesquisas acima da DH) se encontram a um passo a frente no processo de promoção de medidas terapêuticas alternativas.

Por fim, vale notar que a aplicabilidade das técnicas elucidadas pelos artigos envolvendo o sistema nervoso de seres humanos, apesar de estarem em constante desenvolvimento, ainda se encontram distantes de serem protocolos otimizados e são, por hora, inviáveis para aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS

- ALZFORUM. APP Protein Mutations. V. 3.5, 2019, **Alzforum Networking for a Cure**. <https://www.alzforum.org/mutations/app>
- ANGUELA, Xavier M.; HIGH, Katherine A.. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual Review Of Medicine*, [s.l.], v. 70, n. 1, p.273-288, 27 jan. 2019. **Annual Reviews**. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
- AREND, Marcela Corso; PEREIRA, Jessica Oliveira; MARKOSKI, Melissa Medeiros. O Sistema *CRISPR/Cas9* e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 108, n. 1, p. 81-83, Jan. 2017
- ARORA, Leena; NARULA, Alka. Gene Editing and Crop Improvement Using *CRISPR-Cas9* System. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 8, n. 8, p.19-32, 8 nov. 2017. **Frontiers Media SA**. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>.
- AROSS, Christopher; TABRIZI, Sarah J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.83-98, jan. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70245-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70245-3).
- AZALDUMBIDE,; HOEBEN, R C. How not to be seen: immune-evasion strategies in gene therapy. *Gene Therapy*, [s.l.], v. 15, n. 4, p.239-246, 29 nov. 2007. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3303082>.
- Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R. and Wild, E.J., 2015. Huntington disease. **Nature reviews Disease primers**, 1, p.15005.
- BEKRIS, Lynn M. et al. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. **Journal Of Geriatric Psychiatry And Neurology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.213-227, 2 nov. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0891988710383571>.
- BONDI, Mark W.; EDMONDS, Emily C.; SALMON, David P.. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. **Journal Of The International Neuropsychological Society**, [s.l.], v. 23, n. 9-10, p.818-831, out. 2017. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s135561771700100x>.
- CACACE, Rita; SLEEGERS, Kristel; VAN BROECKHOVEN, Christine. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. **Alzheimer's & Dementia**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.733-748, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>.
- CHEVALIER, Brett S. et al. Design, Activity, and Structure of a Highly Specific Artificial Endonuclease. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.895-905, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00690-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00690-1).
- CONG, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using *CRISPR/Cas* Systems. *Science*, [s.l.], v. 339, n. 6121, p.819-823, 3 jan. 2013. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1231143>.
- CORONEL, Raquel et al. Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 55, n. 9, p.7107-7117, 30 jan. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-0914-2>.
- COSTA, F. A. G. et al. Doença de Huntington: uma revisão bibliográfica. In: **II Congresso Nacional de Pesquisa em Ciências Sociais Aplicadas–II CONAPE**. 2013.
- DABROWSKA, Magdalena et al. Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by *Cas9 Nickases*. **Frontiers In Neuroscience**, [s.l.], v. 12, p.1-8, 26 fev. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2018.00075>.

DÉGLON, Nicole. From huntingtin gene to Huntington's disease-altering strategies. **Disease-modifying Targets In Neurodegenerative Disorders**, [s.l.], p.251-276, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-805120-7.00010-5>.

DEVER, Daniel P. et al. *CRISPR/Cas9*  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, [s.l.], v. 539, n. 7629, p.384-389, nov. 2016. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1038/nature20134>.

DEVERMAN, Benjamin E. et al. Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.641-659, 10 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2018.110>.

FRIDMAN, Cintia et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Archives Of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.19-25, 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-60832004000100004>.

FRIEDMANN, Theodore. The Road toward Human Gene Therapy-A 25-year Perspective. **Annals Of Medicine**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.575-577, jan. 1997. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07853899709007485>.

GALIMBERTI, Daniela; GHEZZI, Laura; SCARPINI, Elio. Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 333, n. 1-2, p.50-54, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.12.013>.

GARCÍA-TUÑÓN, Ignacio et al. The *CRISPR/Cas9* system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 16, p.27-40, 9 fev. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.15215>.

Gil-Mohapel JM, Rego AC. Doença de Huntington: Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos.

Gusella, James F., et al. "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." **Nature** 306.5940 (1983): 234.

GYÖRGY, Bence et al. *CRISPR/Cas9* Mediated Disruption of the Swedish APP Allele as a Therapeutic Approach for Early-Onset Alzheimer's Disease. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 11, p.429-440, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2018.03.007>.

HARJES, Phoebe; WANKER, Erich e. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.425-433, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0004\(03\)00168-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0004(03)00168-3).

JANSSEN, J.c. et al. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. **Neurology**, [s.l.], v. 60, n. 2, p.235-239, 28 jan. 2003. **Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health)**. <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000042088.22694.e3>.

KELLEHER, Raymond J.; SHEN, Jie. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 4, p.629-631, 12 jan. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1619574114>.

KHOSRAVI, Mohammad Ali et al. Targeted deletion of BCL11A gene by *CRISPR-Cas9* system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 854, p.398-405, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.042>.

KOCAHAN, Sayad; DOĞAN, Zümrüt. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. **Clinical Psychopharmacology And Neuroscience**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-8, 28 fev. 2017. Korean College of Neuropsychopharmacology. <http://dx.doi.org/10.9758/cpn.2017.15.1.1>.

KOLLI, Nivya et al. Application of the gene editing tool, *CRISPR-Cas9*, for treating neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 112, p.187-196, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.07.007>.

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.l.], v. 18, n. 4, p.754-768, 2 abr. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18040754>.

LAGANOWSKY, Arthur et al. Atomic View of a Toxic Amyloid Small Oligomer. **Science**, [s.l.], v. 335, n. 6073, p.1228-1231, 8 mar. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1213151>.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M.. Alzheimer's disease. **European Journal Of Neurology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.59-70, 19 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ene.13439>.

LEDLEY, Fred D.. Nonviral Gene Therapy: The Promise of Genes as Pharmaceutical Products. Human Gene Therapy, [s.l.], v. 6, n. 9, p.1129-1144, set. 1995. **Mary Ann Liebert Inc.** <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1995.6.9-1129>.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estud. av.**, São Paulo , v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010. Available from &lt;[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-)

LIOU, Stephanie. The Basic Neurobiology of Huntington's Disease (Text and Audio). **Hopes**. 26 Jun 2010. Stanford. Disponível em: <https://hopes.stanford.edu/the-basic-neurobiology-of-huntingtons-disease-text-and-audio/>

MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J.. Huntington's disease: a clinical review. **European Journal Of Neurology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.24-34, 22 set. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ene.13413>.

MONTEYS, Alex Mas et al. *CRISPR/Cas9* Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.12-23, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.010>.

MOSS, Davina J Hensman et al. Identification of genetic variants associated with Huntington's disease progression: a genome-wide association study. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.701-711, set. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(17\)30161-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(17)30161-8).

ORTIZ-VIRUMBRALES, Maitane et al. *CRISPR/Cas9*-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 N141I neurons. **Acta Neuropathologica Communications**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-20, 27 out. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-017-0475-z>.

POON, Anna et al. Generation of a gene-corrected isogenic control hiPSC line derived from a familial Alzheimer's disease patient carrying a L150P mutation in presenilin 1. **Stem Cell Research**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.466-469, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.09.018>.

RAN, F. ann et al. Double Nicking by RNA-Guided *CRISPR Cas9* for Enhanced Genome Editing Specificity. **Cell**, [s.l.], v. 154, n. 6, p.1380-1389, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.

ROHN, Troy T et al. The Potential of *CRISPR/Cas9* Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. **Journal Of Alzheimer's Disease & Parkinsonism**, [s.l.], v. 08, n. 03, p.1-12, 2018. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0460.1000439>.

ROSS, Christopher A. et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.204-216, 11 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.24>.

RUAN, Guo-xiang et al. *CRISPR/Cas9*-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.331-341, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.006>.

SANTOS, SaDNA Larissa Freitas dos et al. *CRISPR*: uma nova era na biologia molecular. **Revista Biotecnologia & amp**; Ciência, Ceres, v. 2, n. 5, p.40-48, out. 2017.

SAUDOU, Frédéric; HUMBERT, Sandrine. The Biology of Huntingtin. **Neuron**, [s.l.], v. 89, n. 5, p.910-926, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>.

SAVANI, Aman A.. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: A randomized controlled trial. **Neurology**, [s.l.], v. 66, n. 3, p.366-372, 13 fev. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

SCHULTE, Joost; LITTLETON, Troy. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. **Curr Trends Neurol**. v. 5, n. 1, p.65-78, 01 jan 2011. The Picower Institute for Learning and Memory

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F., A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiatr**, 2008;30(1 Supl),

SHIN, Jun Wan et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific *CRISPR/Cas9*. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], p.1-11, 15 set. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw286>.

SUN, Jichao et al. A *CRISPR/Cas9* based strategy to manipulate the Alzheimer's amyloid pathway. **Biorxiv**, [s.l.], p.1-15, 28 abr. 2018. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/310193>.

SUN, Linfeng et al. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 4, p.476-485, 5 dez. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1618657114>.

TANDON, Anurag; FRASER, Paul. The presenilins. **Genom e Biology**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.1-3, 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2002-3-11-reviews3014>.

TELENIUS, Håkan et al. Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.409-414, abr. 1994. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0494-409>.

TREVINO, Alexandro E.; ZHANG, Feng. Genome Editing Using *Cas9 Nickases*. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.161-174, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801185-0.00008-8>.

VALLETTA, Simona et al. ASXL1 mutation correction by *CRISPR/Cas9* restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. **Oncotarget**, [s.l.], v. 6, n. 42, p.61-71, 26 nov. 2015. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6392>.

VERME, Garima; MISHRA, Manoj. A REVIEW ON GENE THERAPY: HISTORY, VECTORS, THECNOLGY AND APPLICATION. **World Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacy**. V.5, n.10, p.1334-1355, 16 ago, 2016. Shambhunath institute of Pharmacy.

WANG, Brian; YAN, Shuqi. When and how to use *nickases* for efficient genome editing. **Integrated DNA Technologies**. [s.l.], 14 fev. 2018.

XU, Christine L. et al. Viral Delivery Systems for *CRISPR*. **Viruses**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.28-30, 4 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v11010028>.

XU, Xiaohong et al. Reversal of Phenotypic Abnormalities by *CRISPR/Cas9*-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.619-633, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.022>.

YANG, Su et al. *CRISPR/Cas9*-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 127, n. 7, p.2719-2724, 19 jun. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci92087>.

ZHANG, Xiao-hui et al. Off-target Effects in *CRISPR/Cas9*-mediated Genome Engineering. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 4, p.264-270, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2015.37>.

ZHAO, Zhilong et al. *CRISPR* knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.1-20, 28 dez. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23730>.

ZOLTOWSKA, Katarzyna Marta; BEREZOVSKA, Oksana. Dynamic Nature of presenilin1/ $\gamma$ -Secretase: Implication for Alzheimer's Disease Pathogenesis. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.2275-2284, 22 mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0487-5>.