

RNA de interferência e CRISPR/Cas9 como alternativas terapêuticas para a Doença de Alzheimer

RNA interference and CRISPR/Cas9 as alternative therapeutic for Alzheimer's Disease

Marine Sampaio Goulart Prado¹; Cleide Barbieri de Souza²

¹Graduada em Biomedicina no Centro Universitário Lusíada – UNILUS em Santos – SP

²Centro Universitário Lusíada - Núcleo Acadêmico de Estudos e Pesquisas em Biotecnologia e Biologia Molecular (NAPBBM)

Resumo

Introdução: A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo complexo. Mecanismos como mutação de genes que codificam a proteína precursora amiloide (APP) e a proteína Tau estão envolvidos na doença, evidenciado pelo aumento da produção da proteína β -amiloide, o principal componente das placas senis, e a presença de agregados intraneuronais e emaranhados neurofibrilares, ambos derivados destas respectivas proteínas. Recentes estudos têm demonstrado que a tecnologia de RNA de interferência (RNAi), assim como o sistema CRISPR/Cas9, podem potencialmente controlar a DA, inibindo a expressão proteica de genes específicos, como a APP e da proteína Tau envolvidos na doença, ativando um processo de degradação de uma sequência genômica específica. **Objetivo:** Investigar os efeitos fisiológicos da DA, assim como, reunir informações atualizadas sobre o RNAi e CRISPR/Cas9, e avaliar ambos potenciais terapêuticos nessa doença. **Métodos:** Foi realizada uma revisão bibliográfica buscando artigos acadêmicos relacionados à DA e suas novas possibilidades de tratamento envolvendo o mecanismo de RNA de interferência e CRISPR/Cas9. **Resultados:** Tanto o RNAi quanto CRISPR/Cas9 mostraram ter um grande potencial para a reversão da mutação gênica da DA, capazes de fornecer um método eficiente para aplicações clínicas nessa patologia. Enquanto o uso primário do sistema CRISPR/Cas9 é induzir a edição genética diretamente no DNA, o RNAi é um processo modificador da expressão gênica pós-transcricional. **Conclusão:** Essas ferramentas de silenciamento gênico e edição genômica permitem que sejam possíveis novos tratamentos para DA por meio do controle da expressão de genes relacionados a sua patogênese.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas; Doença de Alzheimer; Terapias gênicas; RNAi; Sistema CRISPR-Cas.

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder. Mechanisms such as the mutation of genes that encode a precursor amyloid protein (APP) and Tau protein are involved in the disease, evidenced by the increased production of β -amyloid protein, the main component of senile plaques, and the presence of intraneuronic and tangled neurofibrillaries aggregates, both derived from these proteins. Recent studies have shown that RNA interference (RNAi) technology, such as the CRISPR/Cas9 system, can potentially control an AD, inhibit the protein expression of altered genes, such as an APP and the Tau protein affected in the disease, activating a process degradation of a specific genetic sequence. **Objective:** To investigate the physiological effects of AD, as well as to gather updated information on RNAi and CRISPR/Cas9, and to evaluate the same therapeutic uses in this disease. **Methods:** A literature review was carried out, looking for academic articles related to AD and its new treatment possibilities involving the RNA interference mechanism and CRISPR/Cas9. **Results:** Both RNAi and CRISPR/Cas9 showed great potential for reversing the genetic mutation of AD, being able to provide an efficient method for clinical applications in this pathology. While the primary use of the CRISPR/Cas9 system is to induce direct genetic editing in DNA, RNAi is a process for modifying post-transcriptional gene expression. **Conclusion:** These genetic silencing and editing tools can use those that can be used for AD by controlling the expression of genes related to their pathogenesis.

Keywords: Neurodegenerative diseases; Alzheimer's disease; Gene therapies; RNAi; CRISPR-Cas system.

Recebido em: 09-12-2020

Publicado em: 29-10-2020

Autor correspondente

Cleide Barbieri de Souza

Endereço: Rua Oswaldo Cruz, 179 - Boqueirão, Santos - São Paulo, 11045-101. – Brasil.

E-mail: cleidebarbieri@gmail.com

1. Introdução

A doença de Alzheimer (DA) tem se tornado atualmente um problema de saúde pública em razão do crescimento populacional de idosos, já que está fortemente associada com indivíduos de

idade avançada¹. Classifica-se como uma doença neurodegenerativa progressiva definida clinicamente por perda de memória e disfunção cognitiva². Mutações do gene da proteína precursora do amiloide, da proteína Tau, das

presenilinas 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2), assim como o polimorfismo da apolipoproteína E (apoE) são exemplos de alterações genéticas que podem aumentar o risco para DA. Atualmente, a farmacologia utilizada na DA baseia-se praticamente no tratamento sintomático³. Dessa forma, o silenciamento de alelos mutantes representa uma estratégia atraente para o tratamento de demências hereditárias⁴. O mecanismo de silenciamento por RNA de interferência (RNAi) pode ser um método terapêutico eficiente para o tratamento da DA⁵. Similar ao RNAi, existe o sistema de edição genômica denominada CRISPR/Cas9. Baseia-se em uma sequência de DNA denominada CRISPR que tem como função clivar e eliminar a sequência genômica de determinado DNA que seja desejada sua deleção⁶.

Para tanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma revisão na literatura a fim de entender a fisiopatologia da DA e a reunião de dados sobre os avanços das pesquisas de inovação biotecnológica envolvendo novos sistemas como o RNAi e o CRISPR/Cas9, assim como sua aplicabilidade no tratamento dessa doença.

2. Metodologia

Foi realizada uma revisão bibliográfica buscando artigos acadêmicos relacionados à Doença de Alzheimer e suas novas possibilidades de tratamento envolvendo o mecanismo de RNA de interferência e CRISPR/Cas9, com o objetivo de reunir e avaliar informações, e conduzir uma atualização das novas evidências científicas para a terapêutica da DA utilizando esses sistemas de edição gênica. Para a coleta de dados, foram utilizadas as ferramentas de banco de dados *online* como Pubmed, Scielo, Medline, Alzheimer's Disease International e outras referências encontradas no Google Acadêmico, nos idiomas inglês e português. Um total de 268 artigos foram encontrados, de acordo com os seguintes descritores: "Alzheimer", "epidemiologia", "fisiopatologia", "therapy", "RNA interference", "CRISPR-Cas". Após leitura de título e resumo, 42 foram excluídos e 134 por serem anteriores ao ano de 2000. Dentre os 92 artigos restantes, foram excluídos aqueles que não envolviam a epidemiologia (n=34) e fisiopatologia (n=16) da DA, e aqueles que não abordavam os mecanismos de RNA de interferência (n=8) e de CRISPR-Cas9 (n=13). Portanto, nesta revisão foram selecionados 21 artigos no total levando em consideração sua relevância para o assunto de acordo com o fluxograma a seguir (Figura 1).

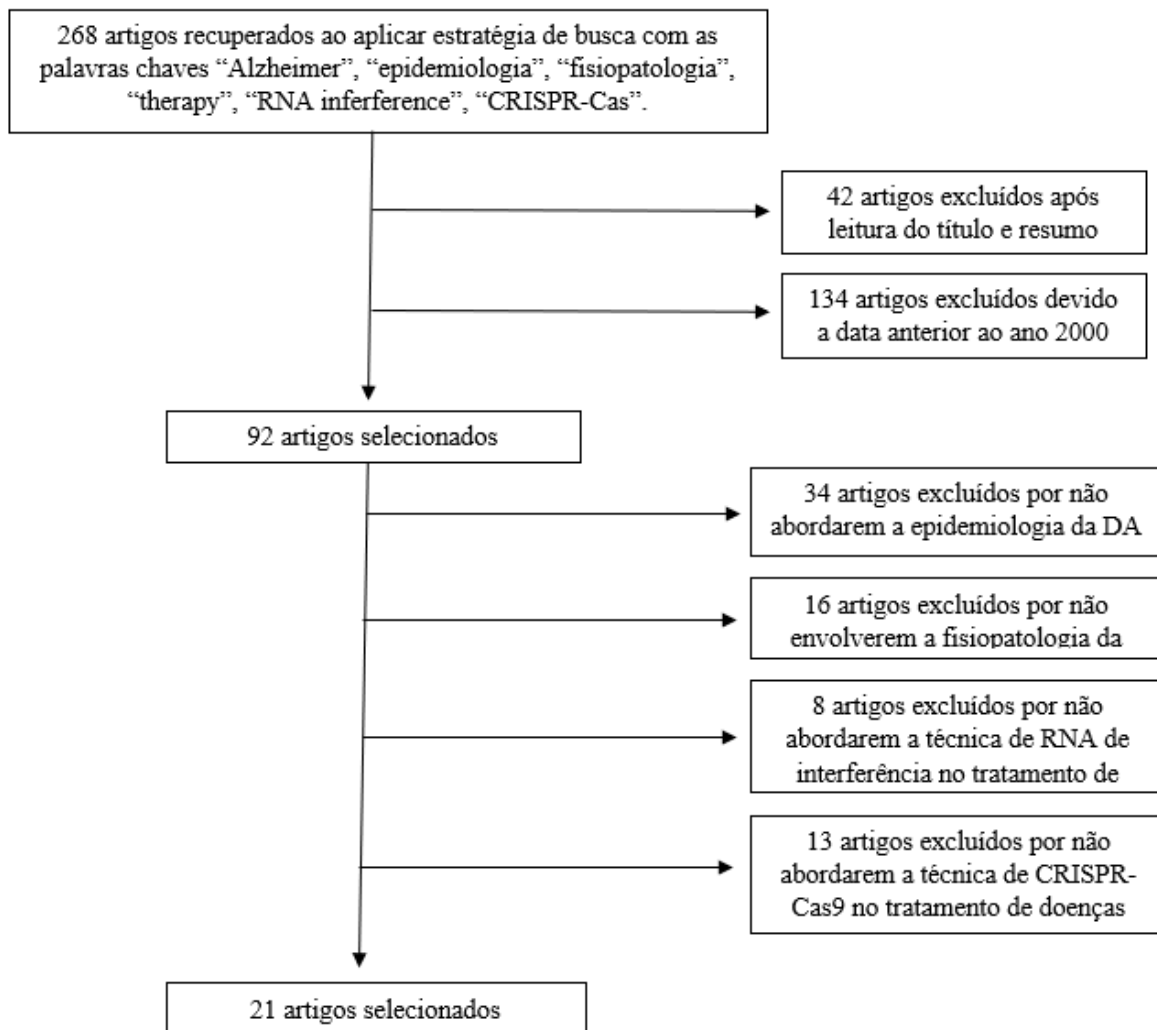


Figura 1 – Fluxograma

3. Resultados e Discussão

Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

A DA é a causa mais comum de demência e foi descrita pela primeira vez em 1906, por um psiquiatra alemão chamado Alois Alzheimer, que identificou em uma de suas pacientes um quadro de déficit de memória, alterações comportamentais e incapacidade de realizar atividades

rotineiras, em conjunto com alterações anatômicas encontradas durante a necropsia do cérebro da sua paciente portadora de DA⁷.

A neuropatologia da DA caracteriza-se por dois tipos de lesões: placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares, do inglês *Neurofibrillary*

tangles (NFT), que são compostos, respectivamente, de β -amiloide (β A), um produto de clivagem da proteína precursora amiloide (APP), e Tau hiperfosforilado, uma proteína associada aos microtúbulos, responsável por estabilizá-los, é abundante nos neurônios do sistema nervoso central. Com esse nível aumentado de fosforilação, a Tau se redistribui no interior do axônio para os dendritos e para o corpo celular do neurônio e se agrega em aglomerados^{2,8}. Esse acúmulo da formação de placas e emaranhado em áreas específicas do cérebro resulta em danos oxidativos e inflamatórios, que, por sua vez, faz com

que células nervosas comecem a perder sua funcionalidade, gerando perdas sinápticas e morte neuronal de regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas. A β -secretase (BACE1) é também uma das principais proteínas envolvidas na produção de $A\beta$. A BACE1 é a enzima que determina a síntese de $A\beta$, na qual cliva a APP para gerar $A\beta$, seu objetivo é fisiológico de clivagem desconhecido. Portanto, a inibição da BACE1 é um dos principais alvos da terapia da DA⁹. Esse acúmulo de $A\beta$ e proteína Tau fosforilada e seus efeitos no cérebro podem ser observados na figura 2.

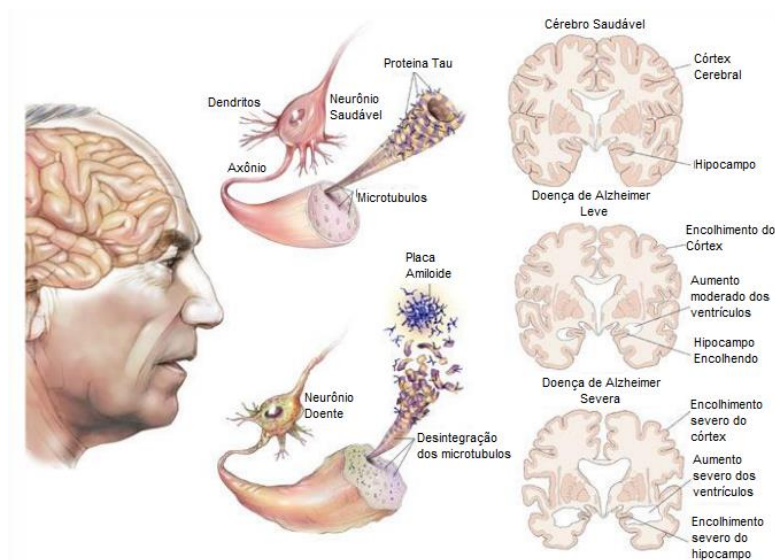


Figura 2 - Fisiopatologia da DA e seus efeitos no cérebro.

Fonte: Adaptado de Veríssimo (2015)¹⁰.

É uma doença multifatorial, em que a idade avançada é o fator de risco mais forte, sugerindo que os processos biológicos relacionados ao envelhecimento podem estar implicados na patogênese da doença. Além disso, a forte associação da DA com o aumento da idade pode refletir parcialmente o efeito cumulativo de diferentes fatores de risco e proteção ao longo da vida, incluindo o efeito de interações complexas de suscetibilidade genética, fatores psicossociais, fatores biológicos e exposições ambientais ao longo da vida estão associados a um risco aumentado de demência, incluindo DA¹¹.

RNA de Interferência (RNAi)

O RNAi foi descoberto pela primeira vez no nematelminto *Caenorhabditis elegans* em 1998 por Andrew Fire e Craig Mello, que consiste na regulação da expressão de genes controlando a síntese de proteína pelo mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, conseguindo bloquear a informação transcrita do DNA por meio da destruição do RNA mensageiro (mRNA). É um mecanismo naturalmente evoluído em vários organismos eucariontes, como resultado de defesa intrínseca contra retrovírus e transposons^{12, 2}.

Esse mecanismo promove o silenciamento gênico pós-transcricional, do inglês *post transcription gene silencing* (PTGS), envolve a degradação do mRNA. Esse sistema se dá por meio de uma molécula de fita dupla de RNA que, ao ser incorporada na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no mRNA alvo, ocasionando assim o silenciamento, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA. Fornece, dessa forma, uma ferramenta poderosa para a criação de fenótipos específicos de genes com mutações de perda de função¹².

De forma mais precisa, seu mecanismo se baseia em genes endógenos que são transcritos como um mRNA longo contendo vários microRNAs (miRNA) agrupados. Os miRNAs são substratos endógenos para a maquinaria de RNAi. São inicialmente expressos como transcritos primários longos (primiRNA) e contêm sequências de bases palindrômicas, de modo que o emparelhamento entre elas gera estruturas de RNA dupla fita na forma de grampo. Posteriormente, essas moléculas são clivadas pela RNAase Drosha formando os pré-microRNA (pré-miRNA) constituídos por cerca de 70 bases, exportadas para o citoplasma pela enzima Exportina-5 e processadas pela

endonuclease Dicer específica de RNA de cadeia dupla. Assim, a Dicer é responsável pela produção de duas classes de pequenos RNAs funcionalmente distintos: MicroRNAs (miRNA) maduros e pequeno RNA de interferência chamado *Small interfering* (siRNA), na qual, o primeiro regula a tradução de mRNA, enquanto o segundo direciona a

destruição de RNA via RNAi^{13,14}. Depois de o dsRNA ter sido processado pela Dicer em siRNA, este é incorporado em um complexo de proteínas chamado de complexo silenciador induzido por RNA, do inglês *RNA induced silencing complex* (RISC) e a cadeia sensível do siRNA é seletivamente clivada (figura 3).

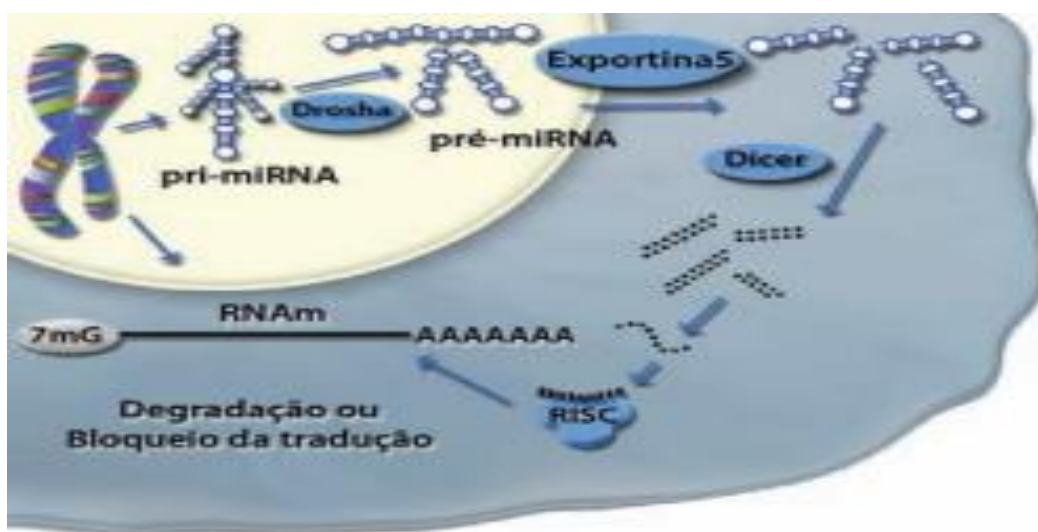


Figura 3 - Mecanismo de ação do RNAi.

Fonte: Menck (2010)¹⁴

Os RNAi são introduzidos nas células a partir de duas maneiras. A primeira se baseia na introdução de siRNA pré-sintetizado nas células alvo, que são processados pela Dicer. A segunda estratégia se baseia na introdução de vetores que codificam o shRNA, o que resulta em silenciamento estável de longa duração na célula. São transportados para o citoplasma por meio

do mecanismo miRNA e processados em siRNA pela Dicer. Embora o uso direto de efetores de siRNA seja simples e resulte em um potente silenciamento gênico, seu efeito é transitório^{15,12}.

Baseado nos estudos de Miller et al. (2004)⁴, é possível projetar siRNA que silenciam seletivamente os alelos mutantes, sem interferir na expressão de alelos normais. Por Tau e APP serem

proteínas chaves na patogênese da doença de Alzheimer, desenvolver mecanismos para inibir a produção dessas proteínas é de grande interesse terapêutico. Como no estudo de Haroon et al. (2019)¹⁶, foi demonstrado o *knockdown* de genes-alvo no cérebro dos camundongos A β PP-PS1 (transgênicos com a doença de Alzheimer), utilizando uma proteína de fusão bifuncional TARBP-BTP projetada em um complexo com siRNA. Houve então um silenciamento gênico concomitante de BACE1, e conseqüente redução da carga de placa no córtex cerebral e hipocampo (> 60%) em camundongos tratados com o complexo. Iranifar et al. (2018)¹⁷ ressalta que o RNAi tem o potencial de ser útil na *downregulating* de genes relacionados na expressão de proteínas relacionadas com a patogênese da DA.

Esse mecanismo, portanto, é bastante simples, pois só é preciso saber a sequência do gene alvo, enquanto a terapia farmacológica tradicional depende do conhecimento da estrutura bioquímica do alvo da proteína, e nem sempre se tem exatidão na determinação dos ligantes ativos¹⁴.

CRISPR/Cas9

O sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Interceptadas em Cluster, conhecido como CRISPR, associado ao sistema de proteína 9 (Cas9) que consiste em pequenas porções do DNA compostas por repetições de nucleotídeos foi descoberto pela primeira vez em *Streptococcus pyogenes* na participação da imunidade adaptativa¹⁸. A transcrição do *locus* CRISPR resulta em pequenos fragmentos de RNA com capacidade de desempenhar o reconhecimento de um gene específico e atuar como um guia de modo a orientar a nuclease Cas9, para promover a clivagem e conseqüente eliminação do DNA alvo¹⁹.

Em seu mecanismo, para substituir a mutação, primeiramente, é formado o RNA guia (gRNA) que corresponde ao fragmento de DNA no genoma que contém o gene alvo que se deseja remover. Posteriormente essa sequência é combinada com a enzima Cas9 para clivar os dois filamentos de dupla hélice do DNA, e assim, a Cas9 irá procurar no genoma de DNA com a sequência correta usando o gRNA. Após o DNA ser clivado, os mecanismos de reparo da célula fixam a quebra preenchendo com uma sequência de nucleotídeos, como ilustrado na figura 4²⁰.

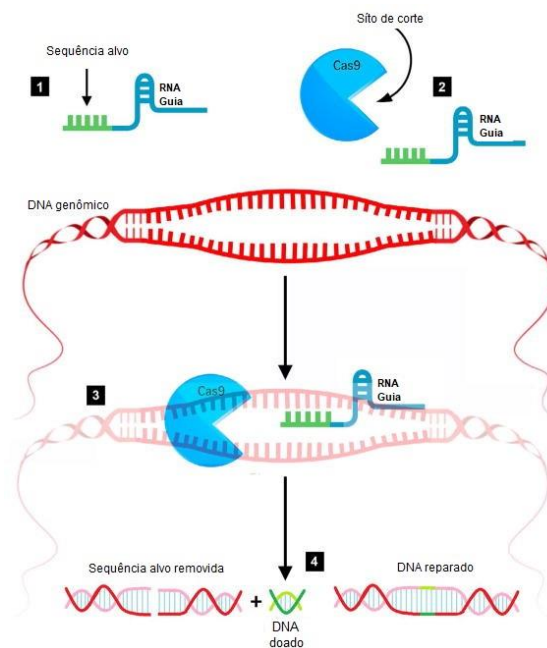


Figura 4 - Edição de um gene utilizando a técnica CRISPR/Cas9.

Fonte: Adaptado de Rohn, Kim e Mack (2018)²⁰.

Na Doença de Alzheimer, segundo Gyorgy et al. (2016)²¹, com o sistema CRISPR/Cas9, é possível interromper seletivamente o local mutado em fibroblastos de indivíduos com e sem a mutação sueca da APP. A mutação sueca, uma das mutações do gene APP, é uma mutação dupla que resulta na substituição de dois aminoácidos, lisina e metionina em asparagina e leucina, é a única mutação conhecida imediatamente adjacente ao sítio da BACE1 na APP e que eleva a produção de A β . A mudança de base dupla adjacente criou uma oportunidade única para interromper seletivamente o alelo mutante com um dos gRNAs. Além disso,

demonstrou uma geração diminuída de A β nos meios condicionados das células tratadas com os gRNAs específicos.

Rohn et al. (2018)²⁰, mostra que o mecanismo CRISPR/Cas9 foi usado para corrigir uma mutação autossômica dominante de PSEN2 N141I, responsável pela troca de adenina para timina, que não causa nenhuma mudança no metabolismo da proteína, mas está relacionada com alterações na clivagem da APP, aumentando a produção de β -amiloide. Logo, a utilização desse mecanismo em neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) corrigiu a mutação N141I levando a uma normalização da quantidade de A β .

4. Considerações finais

Em vista às diversas estratégias terapêuticas farmacológicas utilizadas atualmente para o tratamento da DA não obterem uma cura, e sim a diminuição dos sintomas e controle da progressão da doença, uma alternativa de terapia gênica para extingui-la definitivamente fez-se necessária.

Mecanismos como mutação de genes e disfunção proteica estão envolvidos na DA. Hoje com a análise de fatores genéticos relacionados a DA e estudos avançados com novas tecnologias de edição de genoma, torna-se possível o controle e reversão da doença a nível molecular. A expressão proteica de genes disfuncionais específicos pode ser inibida ou regulada. Além disso, diferentemente dos fármacos convencionais, a manipulação genética é específica, ou seja, gera somente o bloqueio da produção da proteína de interesse, não afetando a síntese de proteínas com estruturas moleculares semelhantes, o que reduz possíveis efeitos adversos. Como demonstrado por Haroon et al. (2019)¹⁶, a entrega de siRNA de BACE1 mediada pela proteína de fusão TARBP-BTP reduz os depósitos de β -amiloide em um modelo de camundongo transgênico da doença de Alzheimer. E ainda, Iranifar et al. (2018)¹⁷ ressaltam que os RNAi são

capazes de promover uma regulação negativa da expressão de proteínas de genes relacionados a patogênese da DA. Assim como, por meio do mecanismo CRISPR/Cas9, Gyorgy et al. (2016)²¹ e Rohn et al. (2018)²⁰, conseguiram modelar mutações em genes, como APP, e PSEN1 e PSEN2, que estão relacionados com alterações na clivagem do APP, levando a uma normalização da quantidade de β -amiloide e revertendo a formação de placas senis.

Assim, a manipulação das ferramentas de silenciamento gênico e edição genômica permite que seja possível ter maior flexibilidade para a busca por novas formas terapêuticas àqueles fatores de risco genéticos específicos que aumentam o risco de demência associado a DA.

5. Declaração de conflito de interesses

Os autores do artigo afirmam que não se encontram em situações de conflito de interesse que possam influenciar o desenvolvimento do trabalho, tais como emissão de pareceres, propostas de financiamento, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, participação em estudos clínicos e/ou experimentais subvencionados; atuação como palestrante em eventos patrocinados; participação em conselho consultivo ou

diretivo; comitês normativos de estudos científicos; recebimento de apoio institucional; propriedade de ações; participação em periódicos patrocinados, assim como qualquer relação financeira ou de outra natureza com pessoas ou organizações que possam influenciar o trabalho de forma inapropriada.

6. Referências

1. APRAHAMIAN, Ivan; MARTINELLI, José Eduardo; YASSUDA, Mônica Sanches. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. Sociedade Brasileira de Clínica Médica, Campinas, v. 7, p.27-35, 05 ago. 2008
2. CHEN, Shun; GE, Xuemei; CHEN, Yinghui; LV, Nan; LIU, Zhenguo; YUAN, Weien. Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. Drug Design, Development And Therapy, [s.l.], v. 7, p.117-125, fev. 2013. Dove Medical Press Ltd..
<http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s40229>.
3. FORLENZA, Orestes V.. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. Archives Of Clinical Psychiatry (São Paulo), [s.l.], v. 32, n. 3, p.137-148, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0101-60832005000300006>.
4. MILLER, V. M.; GOUVION, Cynthia M.; DAVIDSON, Beverly L; PAULSON, Henry L. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. Nucleic Acids Research, [s.l.], v. 32, n. 2, p.661-668, 21 jan. 2004. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh208>.
5. SILVA, Priscilla Ludovico da. O efeito da prolactina na migração de células de câncer de mama pela remodelação da actina no citoesqueleto. São Paulo, out. 2016. Universidade de São Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP.
<http://dx.doi.org/10.11606/t.5.2017.tde-05012017-152308>.
6. WIEDENHEFT, Blake; STERNBERG, Samuel H.; DOUDNA, Jennifer A. CRNAided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, [s.l.], v. 482, n. 7385, p.331-338, fev. 2012. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature10886>.
7. LIMA, Juliane Silveira. Envelhecimento, demência e doença de Alzheimer: o que a psicologia tem a ver com isso? Revista de Ciências Humanas, Florianópolis, v. 40, p.469-489, out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.5007/%25x>. Acesso em: 14 jul. 2018.

8. CABRAL, João Carlos Centurion; VELEDA, Gessyka Wanglon; MAZZOLENI, Martina; COLARES, Elton Pinto; NEIVA-SILVA, Lucas; DAS NEVES, Vera Torres. Stress and Cognitive Reserve as independent factors of neuropsychological performance in healthy elderly. *Ciência & Saúde Coletiva*, [s.l.], v. 21, n. 11, p.3499-3508, nov. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320152111.17452015>.
9. LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.. Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*, [s.l.], v. 2, n. 11, p.320-320, 21 set. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>.
10. VERÍSSIMO, Vasco de Almeida Jorge. Data Acquisition, Curation and Modeling for Integration of Alzheimer's Disease Neuroimaging Data from ADNI in the Translational Biomedicine Platform tranSMART. 2015. 133 f. Tese (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica e Biofísica Perfil em Engenharia Clínica e Instrumentação Médica, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências Departamento de Física, Lisboa, 2015.
11. QIU, Chengxuan; KIVIPELTO, Miia; VON STRAUSS, Eva. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues In Clinical Neuroscience*, [s.l.], v. 11, n. 2, p.111-128, jun. 2009.
12. FRANÇA, Natália Regine de, MESQUITA JÚNIOR, Danilo; LIMA, Amanda Bandeira; PUCCI, Fernando Vianna Cabral; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho; SILVA, Neusa Pereira. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, [s.l.], v. 50, n. 6, p.695-702, dez. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042010000600008>.
13. HUTVAGNER, G.; ZAMORE, Phillip D.. A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science*, [s.l.], v. 297, n. 5589, p.2056-2060, 1 ago. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1073827>.
14. MENCK, Carlos Frederico Martins. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 70, n. 24, p.99-108, set. 2010.

15. AAGAARD, Lars; ROSSI, John J.. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [s.l.], v. 59, n. 2-3, p.75-86, mar. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.005>.
16. HAROON, M.M., Saba, K., Boddredda, V.H. et al. Delivery of BACE1 siRNA mediated by TARBP-BTP fusion protein reduces β -amyloid deposits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biosci* 44,1 (2019).
<https://doi.org/10.1007/s12038-018-9822-x>.
17. IRANIFAR, Elmira; SERESHT, Banafsheh Mirzaei; MOMENI, Fatemeh; FADAEI, Elyas; MEHR, Maysam Havasi; EBRAHIMI, Zahra; RAHMATI, Majid; KHARAZINEJAD, Ebrahim; MIRZAEI, Hamed. Exosomes and microRNAs: new potential therapeutic candidates in alzheimer disease therapy. *Journal of Cellular Physiology*, [S.L.], v. 234, n. 3, p. 2296-2305, 7 set. 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27214>.
18. JINEK, Martin; EAST, Alexandra; CHENG, Aaron; LIN, Steven; MA, Enbo; DOUDNA, Jennifer. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, [s.l.], v. 2, 29 jan. 2013. ELife Sciences Organisation, Ltd..
<http://dx.doi.org/10.7554/elife.00471>.
19. YIN, Hao et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nature Biotechnology*, [s.l.], v. 34, n. 3, p.328-333, 1 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3471>.
20. ROHN, Troy T; KIM, Nayong; ISHO, Noail F; MACK, Jacob M. 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, mai. 2018. OMICS Publishing Group.
<http://dx.doi.org/10.4172/2161-0460.1000439>.
21. GYORGY, Bence et al. 567. CRISPR-Cas9 Mediated Gene Editing in a Monogenic Form of Alzheimer's Disease. *Molecular Therapy*, [s.l.], v. 24, p.226-227, maio 2016. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1525-0016\(16\)33375-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1525-0016(16)33375-5).