

UNIVERSIDADE PAULISTA

ANA KARLA MENDES XAVIER

**CARACTERIZAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR-CAS9 EM MODELOS
EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

NOTA 9,2

GOIÂNIA

2025

NOTA FINAL = 9,2

ANA KARLA MENDES XAVIER

CARACTERIZAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR-CAS9 EM MODELOS
EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina à
Universidade Paulista – UNIP para fins
avaliativos.

Orientador: Prof. Dr. Milton Camplesi Junior

GOIÂNIA

2025

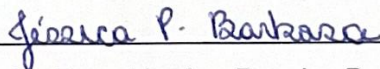
ANA KARLA MENDES XAVIER

CARACTERIZAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR-CAS9 EM MODELOS EXPERIMENTAIS
PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

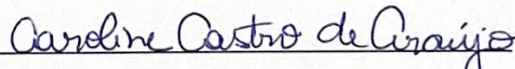
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências da Saúde da
Universidade Paulista, *Campus Flamboyant*,
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 08 / 12 / 2025

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Jéssica Pereira Barbosa
Universidade Paulista - UNIP



Profª. Dra. Caroline Castro de Araújo
Universidade Paulista - UNIP



Prof. Dr. Milton Camplesi Júnior
Universidade Paulista - UNIP

CIP - Catalogação na Publicação

Xavier, Ana karla Mendes

Caracterização da técnica CRISPR-Cas9 em modelos experimentais para o estudo da doença de Alzheimer / Ana karla Mendes Xavier. - 2025.
43 f. : il. color

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) apresentado ao Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Paulista, Goiânia, 2025.

Área de Concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Milton Camplesi Junior.

1. Doença de Alzheimer. 2. CRISPR-Cas9. 3. Beta-amiloide. 4. Neurodegeneração. 5. Edição gênica. I. Junior, Milton Camplesi (orientador). II. Título.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REFERENCIAL TEORICO..... | 10 |
| 2.1 Doença de Alzheimer | 10 |
| 2.2 ApoE 4 como fator de risco para DA | 13 |
| 2.3 Gene APP, PSEN 1 e PSEN 2 | 14 |
| 2.4 Tecnologia CRISPR-Cas9 | 15 |
| 2.5 Aplicações do CRISPR/CAS 9 na DA..... | 16 |
| 3 METODOLOGIA | 18 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 20 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 31 |
| REFERÊNCIAS..... | 32 |

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e sabedoria para chegar até aqui. E todas as vezes em que achei que as coisas estavam desmoronando, percebi que, na verdade, elas estavam se encaixando. Confie no propósito, confie em Deus; às vezes, o caos está apenas reorganizando o seu futuro.

Meu profundo agradecimento ao meu companheiro, Jose Carlos R. Teles, que esteve ao meu lado em cada etapa. Ele foi meu apoio, meu equilíbrio e meu incentivo diário. Em todos os momentos em que pensei em desistir, foi ele quem acreditou em mim, quem me levantou e quem me lembrou do meu potencial.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Milton Camplesi Junior pelas orientações que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. E à minha professora de TCC, Profa. Dra. Caroline Castro, pela dedicação e suporte durante essa etapa tão importante.

Estendo ainda minha gratidão a todas as pessoas que fizeram parte dessa trajetória, desde os professores da faculdade, que contribuíram para minha formação com ensinamentos valiosos, até os meus supervisores de estágio, com quem aprendi muito e que desempenharam um papel fundamental na minha experiência prática e no meu crescimento profissional.

Por fim, deixo meu carinho e agradecimento aos meus amigos da faculdade, que compartilharam comigo os desafios, risos, madrugadas de estudo e momentos de crescimento. Cada conversa, companhia e palavra de incentivo tornaram esta trajetória mais leve e significativa. Sou profundamente grata por ter pessoas tão especiais ao meu redor.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva caracterizada pelo acúmulo dos peptídeos beta-amiloide ($A\beta$) e pela formação de emaranhados neurofibrilares resultantes da hiperfosforilação da proteína tau. Apesar de décadas de pesquisa, a fisiopatologia da DA permanece complexa e multifatorial, e os tratamentos disponíveis ainda não impedem sua progressão. A tecnologia CRISPR-Cas9 tem emergido como uma ferramenta promissora para a investigação de doenças neurodegenerativas, permitindo a modulação precisa de genes associados à patogênese da DA e a criação de modelos experimentais mais representativos. Este estudo realizou uma revisão integrativa da literatura, analisando artigos publicados nos últimos cinco anos sobre o uso do CRISPR-Cas9 na modelagem genética e investigação de processos patológicos relacionados à DA. Os resultados destacam a eficiência da técnica na geração de modelos animais e celulares humanizados, no estudo funcional de mutações nos genes PSEN1, PSEN2 e APOE, e na modulação de vias amiloidogênicas e neuroinflamatórias. Embora os modelos gerados apresentem avanços significativos, nenhum é capaz de reproduzir integralmente a neurodegeneração progressiva observada em humanos. Conclui-se que a edição gênica via CRISPR-Cas9 é uma ferramenta essencial para aprofundar a compreensão da fisiopatologia da DA e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chaves: *Doença de Alzheimer; CRISPR-Cas9; Beta-amiloide; Neurodegeneração; Edição gênica.*

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the accumulation of beta-amyloid (A β) peptides and the formation of neurofibrillary tangles derived from hyperphosphorylated tau protein. Despite extensive research, the pathophysiology of AD remains complex and multifactorial, and current treatments fail to halt disease progression. The CRISPR-Cas9 gene-editing system has emerged as a powerful tool for investigating neurodegenerative disorders, enabling precise modulation of genes associated with AD and the development of more physiologically relevant experimental models. This study performed an integrative literature review of research published in the last five years regarding the application of CRISPR-Cas9 in AD models. The findings demonstrate the technique's effectiveness in generating humanized animal and cellular models, functionally characterizing mutations in PSEN1, PSEN2, and APOE, and modulating amyloidogenic and neuroinflammatory pathways. Although these models provide significant advancements, none fully recapitulates the progressive neurodegeneration seen in humans. Overall, CRISPR-Cas9 represents an essential tool for advancing the understanding of AD mechanisms and supporting the development of future therapeutic strategies.

Keywords: Alzheimer's disease; CRISPR-Cas9; Beta-amyloid; Neurodegeneration; Gene editing.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica e representa a principal causa de demência em indivíduos com mais de 65 anos em todo o mundo (Perluigi; Di Domenico; Butterfield, 2024). Sua fisiopatologia é marcada pela presença de placas senis, que se origina a partir do acúmulo anormal dos peptídeos beta-amiloide ($A\beta$) no meio extracelular, e por emaranhados neurofibrilares, que são formados pela hiperfosforilação da proteína tau no interior dos neurônios (Jiang *et al.*, 2024).

A hipótese amiloidogênica propõe que o acúmulo do peptídeo $A\beta$ no cérebro é o principal fator no desenvolvimento da DA. Esses peptídeos são produzidos a partir do processamento enzimático sequencial da proteína precursora de amiloide (APP) pelas enzimas β -secretase (BACE1) e γ -secretase, que resulta na formação de depósitos extracelulares conhecidos como placas amiloides (Yang *et al.*, 2025). Esses processos levam à morte neuronal, inflamação, atrofia cerebral, entre muitas outras alterações deletérias (Fernandez *et al.*, 2024). Os sintomas iniciais são perda de memória, apatia, depressão e irritabilidade (Bhardwaj *et al.*, 2022).

A DA pode ser classificada como esporádica e autossômica dominante (DAAD). A causa exata DA esporádica ainda não é completamente compreendida, e pode estar associada a fatores genéticos e ambientais. A DAAD é uma forma rara da enfermidade, resultante de mutações nos genes da proteína precursora do amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) ou presenilina 2 (PSEN2). Essa forma segue um padrão de herança autossômica dominante, com início dos sintomas geralmente antes dos 65 anos de idade (Fernandez *et al.*, 2024; Sewell *et al.*, 2024).

Com base na idade de início, a DA também é subdividida em DA de início precoce (DAIP) e DA de início tardio (DAOT), sendo esta última caracterizada pelo surgimento dos sintomas a partir dos 65 anos e representando a forma mais comum da doença. O gene da apolipoproteína E (APOE) é um importante fator de risco para a DAOT. A APOE possui três subtipos: APOE2, APOE3 e APOE4. O alelo APOE4 está associado a um aumento significativo do risco, enquanto o APOE2 exerce um efeito protetor (Jiang *et al.*, 2024).

Apesar de mais de um século de pesquisa sobre DA, não temos tratamentos ou curas eficazes, e aqueles que foram propostos permanecem controversos. Isso provavelmente se deve à etiologia complexa de sua patogênese, que envolve interações entre diversos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Blumenfeld *et al.*, 2024). Os fármacos disponíveis atualmente oferecem apenas alívio sintomático e muitas vezes estão associados a efeitos colaterais como náuseas, perda de apetite, tontura e confusão mental (Pandey; Ramakrishnan, 2020).

A edição do genoma por meio do sistema CRISPR-Cas9 tem se destacado como uma ferramenta promissora no tratamento e na compreensão de doenças humanas. (Plano *et al.*, 2022). Graças à sua simplicidade, baixo custo e alta precisão, o CRISPR-Cas9 tem despertado grande interesse no campo das doenças neurodegenerativas, incluindo a DA. Essa tecnologia pode ser aplicada tanto na criação de modelos animais quanto em modelos celulares que reproduzem com mais fidelidade a fisiopatologia humana (Bhardwaj *et al.*, 2022). Esses modelos permitem estudar as proteinopatias de maneira mais precisa, sem depender da superexpressão de genes humanos nos cérebros dos animais (Zhong *et al.*, 2024).

Considerando o impacto global da DA, o envelhecimento populacional e as limitações dos tratamentos atuais, compreender com mais precisão os processos moleculares envolvidos em sua evolução é essencial. A tecnologia CRISPR-Cas9 surge como uma ferramenta importante, pois permite analisar genes de risco, investigar vias relacionadas à produção de A β e entender melhor os mecanismos que levam às alterações neurodegenerativas. Assim, esta pesquisa é relevante por mostrar como o CRISPR-Cas9 pode tornar o estudo da doença mais preciso e, a partir disso contribuir para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos com maior eficácia. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi explorar o potencial dessa tecnologia na modelagem genética e no estudo dos processos patológicos associados à essa doença.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, responsável por cerca de 60 a 80% dos casos de demência (Khan; Barve; Kumar, 2020; Abubakar *et al.*, 2022). Estima-se que, até 2050, o número global de pessoas afetadas por demência atinja cerca de 150 milhões (Kumar *et al.*, 2024). DA é caracterizado por neurodegeneração progressiva e contínua no cérebro, especialmente nas regiões do hipocampo, lobo temporal, lobos frontais e córtex frontal do cérebro. A neurodegeneração nessas regiões causa as manifestações clínicas do DA, que incluem demência, comprometimento da aprendizagem e disfunção cognitiva progressiva (Lane; Hardy; Schott, 2018).

A DA foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo neurologista alemão Alois Alzheimer, ao estudar o caso de uma paciente com perda de memória, desorientação e alterações comportamentais. Após o falecimento da paciente, ele identificou alterações cerebrais características, como placas amiloides e emaranhados de proteínas tau (Ciurea *et al.*, 2023). Com base nessas observações, Alzheimer caracterizou a condição como uma doença grave do córtex cerebral. Posteriormente, o psiquiatra Emil Kraepelin denominou a enfermidade como “Doença de Alzheimer” pela primeira vez na 8ª edição de seu manual de psiquiatria (Breijyeh; Karaman, 2020).

A hipótese clássica sobre a fisiopatologia da DA é conhecida como hipótese da cascata amiloide, proposta por Hardy e Higgins em 1992. Essa teoria sugere que o acúmulo de peptídeos beta-amiloides é resultantes do desequilíbrio entre a sua produção e eliminação, sendo o principal fator desencadeador da DA. Os peptídeos A β são formados a partir da clivagem da proteína precursora do amiloide (APP), uma glicoproteína transmembrana do tipo 1 que pode ser processada por duas vias: a via não amiloidogênica, por ação das alfa-secretases, ou a via amiloidogênica, por ação das beta-secretases (Fernández-Calle *et al.*, 2022).

Na via amiloidogênica, a APP é cortada primeiro pela β -secretase (BACE1) e depois pela γ -secretase, e gera peptídeos A β , como A β 40 e A β 42. A β . A versão

de 42 aminoácido é considerada o principal A β tóxico na doença de Alzheimer e é altamente propenso à agregação e formação de placas neuríticas no cérebro. Na via não amiloidogênica, a proteína APP é cortada no meio, liberando um fragmento solúvel chamado APP α pela ação da enzima α -secretase. Também podem ser produzidos fragmentos menores de A β , como A β 1-15 e A β 1-16, quando há cortes sucessivos pelas enzimas β -secretase e α -secretase (Hampel *et al.*, 2021; Hida *et al.*, 2025). Em condições normais e saudáveis, a APP é processada pela via não amiloidogênica e um equilíbrio da produção de A β e sua depuração é mantido no cérebro humano (Krishnamurthy *et al.*, 2025).

A proteína tau é responsável por estabilizar os microtúbulos nos neurônios, no entanto na DA ela sofre hiperfosforilação em vários locais específicos. Os locais de fosforilação identificados estão localizados na região N-terminal, na região de repetição, e na região C-terminal. Essa modificação é realizada por enzimas chamadas quinases, como CDK-5, GSK-3 β , CaM quinase II e MAPKs. A hiperfosforilação faz com que a tau se desprenda dos microtúbulos, levando à formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs), que prejudicam o transporte adequado de nutrientes e outras moléculas essenciais dentro dos neurônios. O agregado de A β intensifica esse processo ao aumentar a atividade das enzimas GSK-3 β e CDK-5 que acelera a hiperfosforilação da tau (Zhang *et al.*, 2021).

Essas placas se desenvolvem entre os neurônios e os emaranhados crescem dentro dos neurônios. O desenvolvimento dessas proteínas causa uma perda na conexão entre os neurônios e, assim, quebra a transmissão de mensagens que viajam de uma região para outra no cérebro. O cérebro humano possui cerca de 100 bilhões de neurônios interligados em redes, e cada grupo de neurônios tem funções específicas como pensamento, memória, visão, audição e olfato. Com a progressão da doença, os danos às células cerebrais se intensificam, levando à falha na comunicação entre esses neurônios e à perda irreversível de suas funções (Ahmad *et al.*, 2023).

Além do acúmulo de proteínas anormais, o cérebro com DA também mostra degeneração do hipocampo. Estudos mostram que essa degeneração começa na segunda camada do córtex entorrinal e se estende para o hipocampo, uma região essencial para memória e uma das poucas áreas do cérebro que ocorre a neurogênese na fase adulta. Embora o hipocampo seja naturalmente afetado com o envelhecimento e em outras doenças neurodegenerativas, o nível

de deterioração é significativamente maior na DA (Rao *et al.*, 2022). A deposição desses corpos estranhos em diferentes partes do cérebro é reconhecida pelo sistema imune e inicia um processo inflamatório mediado por células micróglias e liberação de citocinas que eventualmente provocam neurodegeneração e morte celular (Barage; Sonawane, 2015).

As alterações neuropatológicas relacionadas à DA têm início cerca de 20 anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. Essas alterações incluem a deposição de A β , o acúmulo de proteína tau em sua forma patológica e a detecção de biomarcadores indicativos de neurodegeneração. Entre esses biomarcadores estão o hipometabolismo cerebral, observado por tomografia por emissão de pósitrons com fluorodesoxiglicose (PET), a atrofia cerebral detectada por ressonância magnética estrutural (MRI) e os níveis elevados de tau total e luz de neurofilamento no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Clevenger *et al.*, 2025).

A DA começa com um longo estágio pré-clínico, que pode durar de 20 a 30 anos, durante o qual as placas amiloides se formam sem causar sintomas clínicos. Em seguida, ocorre um estágio prodrômico, geralmente de 3 a 5 anos, caracterizado por comprometimento cognitivo leve. Por fim, alguns casos evoluem para demência, mas nem todos (Blumenfeld *et al.*, 2024).

O diagnóstico definitivo da DA ainda requer avaliação *post-mortem* do tecido cerebral. No entanto, o uso de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano e exames de PET, associados a critérios clínicos atualizados, pode auxiliar no diagnóstico em pacientes vivos. Os tratamentos disponíveis, como os inibidores da colinesterase e a memantina, melhoram a qualidade de vida dos pacientes e cuidadores, mas não impedem a progressão da doença (Mossello; Ballini, 2012).

Apesar da sua causa exata não ser completamente compreendida, estudos indicam que fatores genéticos desempenham um papel importante na doença. Uma pequena porcentagem dos casos de DA está relacionada a mutações genéticas dominantes em três genes: *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*. Essas mutações estão geralmente associadas às formas de início precoce da doença, em que os sintomas surgem antes dos 65 anos. A maioria dos pacientes apresenta a forma tardia da Doença de Alzheimer, que surge mais tarde na vida e ocorre de forma esporádica. Embora não seja hereditária nem possua uma causa genética única, evidências indicam a influência de diversos fatores genéticos de risco, sendo o mais significativo a presença do alelo E4 do gene

ApoE (Rostagno, 2023).

2.2 ApoE 4 como fator de risco para DA

Os principais fatores de risco para DA de início tardio são o alelo da apolipoproteína E4 (*APOE4*) e a mutação no gene *APOE* que transcreve a proteína apolipoproteína E (MICHA, 2017). O gene *ApoE* está situado no cromossomo 19q13.32 com um total de 3597 bases, quatro éxons e três íntrons. Ele apresenta três alelos principais: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. A variação genética no *locus* *APOE* induz três isoformas comuns: *APOE2* e *APOE3* e *APOE4* que são codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, respectivamente. Dentre eles, o $\epsilon 3$ é o mais comum, representando 60% a 90% da variação alélica, enquanto as frequências dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ variam entre 0% a 20% e 10% a 20%, respectivamente (Fan *et al.*, 2019). No entanto, indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam um risco aumentado de desenvolver DA esporádica e tendem a manifestar a doença em uma idade média mais precoce em comparação aos não portadores (Dong *et al.*, 2025).

A *APOE* codifica a apolipoproteína E, uma glicoproteína de 33–37 kDa que é produzida por hepatócitos, adipócitos e macrófagos fora do SNC e afeta o conteúdo de colesterol celular e o metabolismo de lipoproteínas por meio do efluxo de colesterol e transporte reverso de colesterol. No cérebro, *APOE* é comumente expresso por astrócitos e, em menor extensão, por pericitos, oligodendrócitos, plexo coroide e neurônios sob condições fisiológicas estressadas (Flowers SA, 2020; Nguyen *et al.*, 2021). No cérebro, ela facilita o transporte de colesterol e outros lipídios para os neurônios, por meio de interações com receptores na superfície celular. Além de sua função no metabolismo lipídico, a *ApoE* participa de diversos processos neurológicos essenciais, incluindo o processamento do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), crescimento neural e imunorregulação (Valdez-Gaxiola *et al.*, 2024).

A variante *ApoE4* tem um papel importante na patogênese da DA por favorecer o acúmulo da proteína beta-amiloide ($A\beta$) no cérebro. Em vez de auxiliar na eliminação dessa substância, como ocorre com outras isoformas da *ApoE*, a *ApoE4* contribui para o acúmulo e a formação de placas amiloides, que estão associadas à morte neuronal e ao declínio cognitivo. Fragmentos da

ApoE4 se ligam à A β e agravam ainda mais esse acúmulo. Além disso, pessoas com essa variante apresentam menor expressão do receptor relacionado à sotelina SORL1, que pode se ligar ao A β e direcioná-lo aos lisossomos para degradação. A ApoE4 também ativa a cinase MAP ERK1/2 e induz a fosforilação de cFos, estimula o fator de transcrição AP-1, resultando em transcrição aprimorada da APP, aumento da expressão da APP e, conseqüentemente, aumento da A β (Sun; Wang; Huang, 2023).

2.3 Gene APP, PSEN 1 e PSEN 2

Mutações dominantes que causam a DA familiar de início precoce estão localizadas no gene da *APP* ou nas presenilinas, que são subunidades catalíticas da γ -secretase. Essas mutações alteram o processamento proteolítico da APP de formas que aumentam a razão A β 42/A β 40 ou tornam os peptídeos A β resultantes mais propensos à autoagregação (Zhao *et al.*, 2020).

O gene *APP* codifica a proteína precursora de amiloide (APP) e está situado no braço longo do cromossomo 21 na região 21q21.3. Esse gene possui 18 éxons, sendo que as mutações associadas à doença de Alzheimer ocorrem, principalmente, nos éxons 16 e 17. Localizada na membrana das células nervosas, funciona como um receptor de superfície e participa de diversos processos celulares, como o crescimento e a adesão neuronal, axonogênese, mobilidade celular e regulação da transcrição. Além disso, desempenha papéis importantes em processos fisiológicos, incluindo migração, diferenciação, plasticidade e sinaptogênese neuronal, além de atuar na sinalização promovida pela netrina-1 durante o crescimento de axônios comissurais (Ovchinnikov *et al.*, 2018; Ribeiro; Dos Santos; De Souza, 2021).

A neuropatologia da DA está presente em praticamente todas as pessoas com síndrome de Down a partir dos 40 anos de idade, devido a presença de três cópias do gene *APP*, que está localizado no cromossomo 21. Essa trissomia leva à superprodução e ao acúmulo de A β . Estima-se que a superexpressão leve de APP (aproximadamente 20%) já é suficiente para elevar o risco de DA na população em geral, enquanto indivíduos com SD apresentam um risco ao longo da vida superior a 95%. Por outro lado, uma mutação sem sentido (A673T) na APP, que reduz a clivagem da APP pela β -secretase, oferece proteção contra a

DA e o declínio cognitivo relacionado à idade. Esses achados reforçam a ideia de que a superexpressão da proteína APP é um patomecanismo da DA (Hung *et al.*, 2024; Larsen *et al.*, 2024).

O gene *PSEN1* situado no cromossomo 14 e o gene *PSEN2* situado no cromossomo 1, codificam as proteínas transmembrana que integram o núcleo catalítico do complexo γ -secretase, essencial na clivagem de proteínas tipo I, como APP e NOTCH. Mutações no *PSEN1* respondem por 18% a 50% dos casos autossômicos dominantes da Doença de Alzheimer de Início Precoce (EOFAD) e estão associadas ao aumento da razão A β 42/A β 40. De maneira semelhante, mutações no *PSEN2* também elevam essa razão, embora, quando comparadas com as do *PSEN1*, produzam níveis mais baixos de A β 42. Mutações sem sentido no gene *PSEN2* raramente levam à EOFAD em comparação às mutações no gene *PSEN1* (Krishnamurthy *et al.*, 2025).

2.4 Tecnologia CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 foi identificado como um mecanismo imunológico adaptativo presente em procariotos, especialmente em bactérias e arqueias. A sigla CRISPR, que significa “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”, descreve sequências curtas e repetitivas de DNA encontradas nos genomas desses microrganismos. A descoberta do sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação como uma poderosa ferramenta de edição genética abriram novas perspectivas terapêuticas, permitindo intervenções diretas nas causas genéticas de diversas doenças (Khan, Mohamad Sultan *et al.*, 2025).

Esse sistema utiliza a endonuclease Cas9 associada a um RNA guia único (sgRNA), que direciona a enzima para uma sequência genômica específica por meio do pareamento de bases complementares (Chen, Minjiang *et al.*, 2019). E a proteína Cas9 atua como uma tesoura molecular capaz de cortar fitas duplas de DNA (Bhardwaj *et al.*, 2022). O reconhecimento do sítio alvo depende da complementariedade entre o espaçador do crRNA e sequência alvo, além da de uma sequência PAM específica na região do alvo (Gleditsch *et al.*, 2019).

A proteína Cas9 gera uma quebra de padrão duplo após reconhecer a sequência do gene alvo. Subsequentemente, duas vias distintas podem ser

iniciadas para reparar essa quebra, ou seja, reparo direcionado por homologia (HDR) ou união de extremidades não homólogas (NHEJ). O NHEJ permite a introdução de mutações de deslocamento de quadro de leitura, resultando em nocaute gênico (KO), enquanto a recombinação homóloga dependente de molde (HDR) possibilita a substituição ou inserção de sequências gênicas (knock-in, KI) por meio de um DNA molde fornecido (Jinek *et al.*, 2012).

Embora os sistemas CRISPR/Cas apresentem um enorme potencial para a medicina translacional, os efeitos fora do alvo ainda representam um desafio significativo. Esses efeitos ocorrem quando a Cas9 realiza clivagens em regiões genômicas não desejadas, o que pode gerar alterações imprevisíveis e potencialmente prejudiciais. Sabe-se que esses eventos são fortemente influenciados pela sequência do sgRNA, uma vez que a Cas9 consegue tolerar até três incompatibilidades entre o sgRNA e o DNA genômico (Guo *et al.*, 2023).

Nesse cenário, ferramentas *in silico* são úteis para identificar potenciais locais fora do alvo em todo o genoma e calcular a probabilidade de uma edição fora do alvo (NAEEM *et al.*, 2020).

2.5 Aplicações do CRISPR/CAS 9 na DA

A técnica de CRISPR/Cas9 tem sido empregada na criação de modelos celulares e animais para diversas doenças neurológicas, o que permite aos pesquisadores compreender melhor os mecanismos da doença e buscar respostas para as causas subjacentes de distúrbios neurológicos graves, como a DA (Schrauben; Dempster; Lunnon, 2020).

Modelos animais, criados por meio da superexpressão de genes humanos alterados para produzir proteínas tau e A β , têm sido eficazes para estudar a patogênese da DA, mas sua aplicabilidade é limitada, pois a maioria dos camundongos com DA não apresenta neurodegeneração real. Modelos mais recentes, utilizando essa tecnologia, oferecem uma melhor representação do fenótipo da doença, permitindo estudar os genes prejudiciais e, potencialmente, identificar tratamentos mais eficazes (Soni *et al.*, 2024).

Os modelos celulares são fundamentais nos estudos de doenças neurológicas, pois não envolvem questões éticas, possuem menor custo e permitem experimentos em curto prazo. Diversas linhagens celulares têm sido

utilizadas, como as de neuroblastoma humano (SH-SY5Y e SK-N-SH), neurônios hipocâmpais de camundongo (HT22), células gliais (BV2) e neuroblastoma de camundongo (N2a) (Lu *et al.*, 2021).

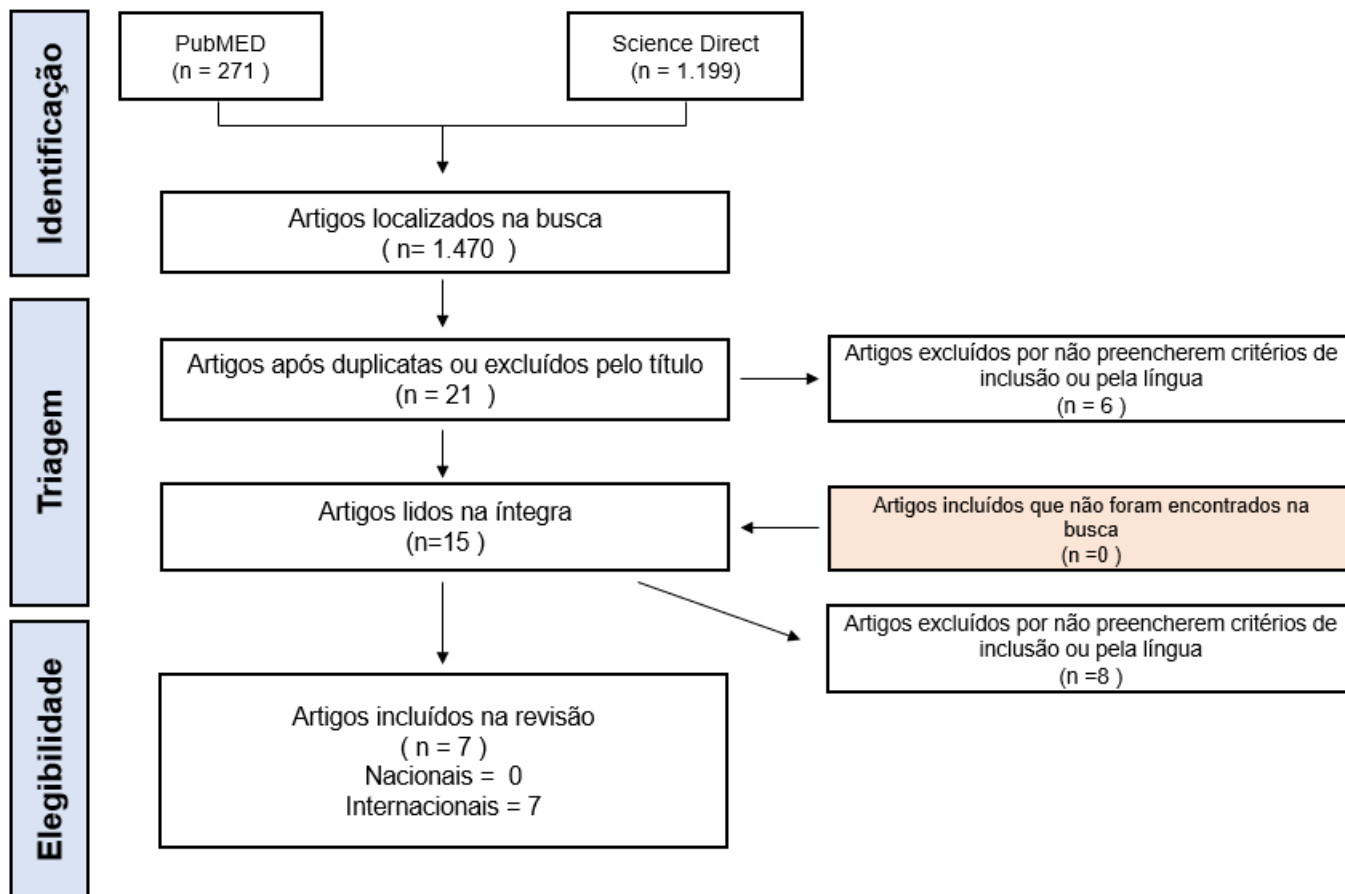
3 METODOLOGIA

O presente trabalho foi uma revisão integrativa da literatura, composta por artigos no idioma inglês publicados nos últimos cinco anos na base de dados *U.S. National Library of Medicine* (PubMed) e *Science Direct*. A partir de buscas realizadas nos descritores de busca *MeSH terms* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), as palavras-chave que melhor descrevem o tema e serão utilizadas como estratégias de busca são “*Alzheimer Disease*”, “*CRISPR-Cas9*”, “*Gene Editing*”, “*Amyloid beta-Peptides*” em inglês, e “Doença de Alzheimer”, “Sistemas CRISPR”, “Edição Genética” e “Peptídeos beta-amiloides”, em português, combinados pelos operadores booleanos *AND* e *OR*.

Os critérios de inclusão para a seleção dos artigos foram estudos do tipo experimental, que apresentem associação entre o uso da tecnologia CRISPR-Cas9 na edição e modulação de genes associados à formação de placas beta-amiloides na Doença de Alzheimer. Artigos que não contenham seleção de dados originais, relatos de caso, notas técnicas, editoriais e estudos que abordem a edição gênica em outros contextos que não estejam relacionados à Doença de Alzheimer, serão excluídos durante a busca bibliográfica.

Inicialmente, a seleção dos artigos se deu a partir da aplicação dos filtros anteriormente descritos, resultando em um total de 1.470 artigos encontrados. Após a leitura do título e exclusão das duplicatas 21 artigos seguiram no processo de seleção de resultados. Desse total, 6 artigos foram excluídos após a leitura da conclusão e resumo por não corresponderem aos critérios de inclusão, totalizando 15 artigos que foram lidos na íntegra, sendo todos artigos internacionais. A Figura 1 ilustra as etapas de seleção de artigos desta revisão.

Figura 1. Etapa de seleção dos artigos incluídos na revisão integrativa sobre o uso da tecnologia CRISPR-Cas9 na doença de Alzheimer.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da busca dos resultados foram encontrados 7 artigos satisfatórios, todos eles estudos do tipo experimental realizados em ratos, camundongos e células *in vitro*. Os pontos destacados na tabela de resultados incluem os autores, local, público-alvo, objetivo, metodologia e resultados de cada estudo. Os principais resultados encontrados acerca do tema estão dispostos na tabela 1.

A agregação e o acúmulo de peptídeos A β no cérebro são considerados eventos iniciais na patogênese da DA (Ashrafian; Zadeh; Khan, 2021). Nos estudos analisados a técnica de CRISPR-Cas 9 mostrou-se bastante eficiente na geração de modelos experimentais mais fiéis à fisiopatologia humana e na modulação direta de genes relacionados à produção e degradação desses peptídeos. A maioria dos modelos de roedores para DA é baseada na expressão da sequência humana da APP, inserida no genoma por meio de minigenes artificiais (Sasaguri *et al.*, 2017). Embora a patologia A β pudesse ser encontrada na maioria dos modelos transgênicos App gerados anteriormente, a superexpressão de APP levanta dúvidas quanto à origem dos fenótipos descritos nesses animais, que podem ser resultantes tanto das mutações inseridas quanto da superexpressão de APP, ou ambos (Pang *et al.*, 2021).

No estudo de Serneels *et al.* (2020) cujo objetivo foi aprimorar os modelos animais ao humanizar os genes APP de camundongos e de ratos. Esse novo modelo denominado *Apphu/hu* teve três resíduos de aminoácidos (G676R, F681Y e R684H) humanizados, localizados na região responsável pela geração do peptídeo A β . Essas três substituições de aminoácidos na sequência A β diminuem o processamento BACE1 da APP de roedores em comparação à APP humana (Strooperl *et al.*, 1995).

A partir dessa modificação foi possível observar um processamento mais semelhante ao humano pela β -secretase. A análise funcional mostrou que a humanização não alterou a quantidade total de APP, mas aumentou os fragmentos β -CTF e reduziu os α -CTF, favorecendo a via amiloidogênica, pois o β -CTF humanizado fornece um substrato melhor para BACE1. Como consequência, houve elevação dos níveis de A β 40.

Tabela 1. Uso da técnica de CRISPR-Cas9 em modelos murinos e celulares para estudo da doença de Alzheimer.

| Autores / Local | Público-alvo | Objetivo | Método | Resultados |
|---|--|---|--|---|
| (Serneels <i>et al.</i> , 2020). Bélgica | 3 camundongos e 3 ratos fêmeas e 3 machos dos genótipos indicados, com idade de 14 semanas | Desenvolver modelos de camundongos e ratos com sequência humana da APP para estudar o processamento da β -secretase | -Modelagem computacional do complexo β -CTF humano–BACE1 foi usada para comparar o processamento da APP em roedores e humanos. Três resíduos principais foram humanizados (G676R, F681Y, R684H) nos genomas de camundongos e ratos via CRISPR-Cas9. Além disso, foi introduzida a mutação <i>M139T</i> , associada à DAF, no gene endógeno <i>PSEN1</i> de ratos | - Gene <i>APP</i> humanizado -A humanização da sequência A β aumentou a eficiência do processamento pela <i>BACE1</i> - \uparrow β -CTF e \downarrow α -CTF em ratos e camundongos e como consequência \uparrow A β 40 - Mutação <i>M139T</i> \uparrow a proporção de A β 42/A β 40, \downarrow A β 38 e A β 43, sem afetar o total de A β . -O MAPT dos ratos apresentou <i>splicing</i> mais semelhante ao humano. -Nenhuma formação de emaranhados ou placas foi observada até a idade de 2 anos |
| (Muñoz; Garner; Ooi, 2021) Austrália | Cultivo de células de neuroblastoma humano SK-N-SH | Gerar uma linhagem SK-N-SH com expressão reduzida de APOE para estudar seu papel e interação com HtrA1 | Uso de CRISPR/Cas9 lentiviral para atingir o éxon 4 de <i>APOE</i> . Clones selecionados por resistência à puromicina e confirmados por sequenciamento, qRT-PCR e <i>Western blot</i> . Avaliou-se morfologia, neuritogênese e expressão de <i>HtrA1</i> | Clones apresentaram redução >70% da expressão de <i>APOE</i> e diminuição de HtrA1. Não houve alteração na proliferação ou neuritogênese, mas as células exibiram predomínio do fenótipo neuronal (tipo N). Novo modelo útil para estudar apoE e Alzheimer. |

| | | | | |
|--------------------------------------|---|---|--|---|
| (Yang <i>et al.</i> , 2025) China | Soro de 52 pacientes com DA e 38 controles e LCR de 5 pacientes com CCL e 8 com DA. -Média de idade: CCL = 75 anos e DA = 78 anos. - Ratos ST6Gal-I +/+ e ST6Gal-I -/-. - Células de N2a | Investigar o papel da enzima ST6Gal-I, na regulação de BACE1 e na formação de peptídeos Aβ42 associados à DA, e avaliar o impacto da deleção de ST6Gal-I sobre a progressão e sintomas cognitivos da doença | - Edição gênica via CRISPR-Cas9 para gerar ratos ST6Gal-I -/-. - Indução de déficit cognitivo com scop (2 mg/kg/dia por 21 dias) em ratos ST6Gal-I +/+ e ST6Gal-I -/- com 12 semanas de idade. - Testes comportamentais: MWM, NOR e Construção de Ninho. - Análises laboratoriais: RNA-seq, RT-qPCR, imunofluorescência, imunoprecipitação, <i>blotting</i> com lectina | - ST6Gal-I e α2,6-sialilação aumentadas em cérebros e soros de pacientes e camundongos com DA - <i>Knockout</i> de ST6Gal-I reduziu a expressão de BACE1 e a formação de Aβ42, além de melhorar a memória e o aprendizado dos ratos. - A ausência de ST6Gal-I aumentou a ubiquitinação de BACE1, acelerando sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma - ↓ de proteínas pró-apoptóticas e ↑ da proteína antiapoptótica Bcl-2 |
| (Asanomi, 2024) Japão | Cultivo de células HEK293 | Compreender como a variante <i>G186R</i> influencia as funções da SHARPIN e de que forma isso pode contribuir para os mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento da DAIT | - Inserção da mutação SHARPIN <i>G186R</i> via CRISPR-Cas9 em células <i>HEK293</i> - <i>PCR-Invader</i> e sequenciamento de Sanger para confirmar a mutação. - Ensaio de luciferase para avaliar a ativação da via NF-κB e Kit Elisa humano para quantificar os Aβ | - A mutação <i>G186R</i> reduziu significativamente a ativação da NF-κB e houve aumento na secreção de Aβ 40 e 42 em células com a mutação, o que indica que a mutação pode contribuir para inflamação cerebral alterada e acúmulo de Aβ, fatores ligados à DA |

| | | | | |
|---|--|--|--|---|
| (Konstantinidis <i>et al.</i> , 2022) Suécia | Fibroblastos de 6 portadores da mutação PSEN1 <i>M146L</i> e de 4 indivíduos controles (2 familiares e 2 não relacionados) | Avaliar se a interrupção específica do alelo <i>PSEN1</i> <i>M146L</i> em fibroblastos <i>PSEN1</i> <i>M146L/WT</i> leva a uma normalização da razão A β 42/40 e se essa alteração tem algum efeito na conformação alterada da PS1 associada à mutação | -Fibroblastos humanos tratados com o sistema CRISPR-Cas9 para interromper seletivamente o alelo mutante. A eficiência da edição foi verificada por sequenciamento de Sanger e NGS, e análises de FRET/FLIM e <i>Western blot</i> avaliaram alterações estruturais da PS1. Também foram medidos a razão A β 42/40, os níveis de ATP e a viabilidade celular | - O tratamento com CRISPR-Cas9 interrompeu com sucesso o alelo PSEN1 <i>M146L</i> em até 67,7% das células, sem afetar o alelo tipo selvagem - Houve redução significativa na razão A β 42/40 nos fibroblastos tratados, indicando restauração parcial do equilíbrio amiloide - As análises de FRET/FLIM mostraram que a conformação da PS1 nas células tratadas se aproximou da forma normal (menos compacta) -Não foram detectadas alterações nos níveis de ATP nem redução da viabilidade celular após o tratamento |
| (Pimenova; Goate, 2020) Estados Unidos | Cultivo de células de neuroblastoma de camundongo N2A | Desenvolver uma linhagem celular duplamente <i>knock-out</i> para <i>PSEN1</i> e <i>PSEN2</i> e validar mutações associadas à DA | CRISPR/Cas9 foi usado para gerar células N2A duplo KO (<i>PSEN1/PSEN2</i>). As células foram transfectadas com variantes humanas (mutantes e normais) de <i>PSEN1</i> e <i>PSEN2</i> . A produção de A β foi medida por ELISA, e o complexo γ -secretase por <i>Western blot</i> | As células duplo KO aboliram a produção de A β . A reintrodução de <i>PSEN1</i> ou <i>PSEN2</i> restaurou os níveis normais. Mutações conhecidas aumentaram a razão A β 42/A β 40, confirmando sua patogenicidade. Novas mutações (<i>PSEN1</i> <i>V142F</i> , <i>G206V</i> e <i>G206D</i>) também alteraram a produção de A β . |

| | | | | |
|--|--|--|--|---|
| (Tambini; D'Adamio, 2020) Estados Unidos | 110 ratos distribuídos por sexo e genótipo da seguinte forma: 12 fêmeas s/s, 29 fêmeas LF/s, 13 fêmeas LF/LF, 20 machos s/s, 27 machos LF/s e 9 machos LF/LF | Estudar efeitos precoces da mutação PSEN1 ^{L435F} em ratos com APP humanizado | - Edição genica via CRISPR-Cas9 para gerar ratos Knockin PSEN L435F; validação genética (sequenciamento Sanger e RT-qPCR); análises bioquímicas (<i>Western blot</i> , ELISA); imunoprecipitação γ -secretase; RT-qPCR <i>Notch</i> ; histologia e imunohistoquímica | - As mutações foram inseridas corretamente nos genomas Psen1 LF/w e Psen1 LF/LF. - Ratos Psen1 LF/LF. tiveram acúmulo de substratos CTF: APP- α CTF \uparrow ; APP- β CTF \uparrow ; N-cad-CTF \uparrow enquanto os Heterozigotos e selvagens estavam normais. - \downarrow de A β 38, A β 40 e A β 42, e com razão A β 42/A β 40 \uparrow ; A β 43 \uparrow . - \downarrow produtos da γ -secretase (A β) + \downarrow autocatálise de PS1 + \uparrow substratos (APP- β CTF, APP- α CTF, N-cad-CTF) \rightarrow perda de função da γ -secretase. - Sinalização Notch preservada - Sem placas A β , sem astrogliose ou microgliose em P15. Neurodesenvolvimento normal |
|--|--|--|--|---|

Legenda: \downarrow = redução / \uparrow = aumento; APP = Proteína precursora amiloide; A β = Peptídeo beta amiloide; β -CTF = Fragmento carboxi-terminal da proteína precursora de beta; α -CTF = Fragmento C-terminal alfa; BACE1 = β -secretase; PSEN1 = Presenilina 1; PSEN2 = Presenilina 2; MAPT = Proteína tau associada a microtúbulos; APOE = Apolipoproteína E; HtrA1 = Protease serina A1; ST6Gal-I = beta-galactosídeo alfa-2,6-sialiltransferase 1; Bcl-2 = Proteína antiapoptótica; NF- κ B = Fator nuclear kappa B; SHARPIN = Proteína associada ao domínio RH de Shank; N-cad = N-caderina; γ -secretase = gama-secretase; DA = Doença de Alzheimer; DAIT = Doença de Alzheimer de Início Tardio; CCL = Comprometimento cognitivo leve; LCR = Líquido cefalorraquidiano; KO = *knockout*; KI = *knockin*; WT = Tipo selvagem; RT-qPCR = Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa; RNA-seq = Sequenciamento de RNA; ELISA = Ensaio imunoenzimático; HEK293 = Células embrionárias humanas do rim; N2A = Células de neuroblastoma de camundongo; SK-N-SH = Células de neuroblastoma humano; FRET/FLIM = Microscopia de transferência de energia por ressonância/tempo de vida da fluorescência; NGS = Sequenciamento de nova geração; MWM = Labirinto aquático de Morris; NOR = Reconhecimento de objeto novo; scop = Escopolamina.

Fonte: elaboração própria (2025).

Os camundongos e ratos contendo a sequência de A β humanizada no gene *APP* endógeno representam modelos experimentais aprimorados, capazes de produzir aproximadamente três vezes mais A β humano em comparação às linhagens selvagens, embora ainda apresentem níveis duas vezes menores que os observados em humanos. Esse modelo apresentou melhor representatividade molecular para estudos futuros de patogênese e terapias direcionadas, sendo um importante avanço para superar as limitações de modelos anteriores.

Atualmente existem mais de 500 variantes relatadas nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* em pacientes com DA (<https://www.alzforum.org/mutations>). Uma maneira de facilitar a caracterização da patogenicidade de uma mutação é estudar sua função biológica utilizando linhagens celulares *in vitro*.

Diante disso, Pimenova; Goate (2020) desenvolveram uma nova linhagem de neuroblastoma de camundongo com uma dupla deleção dos genes *PSEN1* e *PSEN2*. Essa nova linhagem foi denominada N2A-PS1/2KO-8/71, e tinha como o objetivo de avaliar o impacto das mutações nas presinilinas sobre a atividade da γ -secretase e na formação dos peptídeos A β . Primeiro foi realizado o nocaute no exón 3 do gene *PSEN1*. Dois clones (8 e 35) apresentaram ausência da proteína PS1 e redução de cerca de 70% do mRNA de *PSEN1*. Apesar disso, a produção dos peptídeos A β 40 e A β 42 manteve-se estável, devido ao aumento compensatório da expressão de presenilina 2, codificada pelo gene *PSEN2*.

Em outros estudos apesar da presença ou ausência de um aumento compensatório na expressão de PS2 após o *knockout* de PS1, a produção de A β 40 e A β 42 em com *knockout* único de PS1 em neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas é consistentemente reduzida (Arber *et al.*, 2019). No entanto, as linhagens N2A do estudo de Pimenova; Goate (2020) e HEK293T (Lessard *et al.*, 2019) mostram produção sustentada de A β , essa discrepância sugere que pode haver diferenças na natureza precisa dos componentes ativos da γ -secretase, incluindo moduladores entre espécies e tipos celulares, levando a diferenças na acessibilidade do substrato.

Para eliminar essa compensação, o clone N2A-PS1KO-8 foi novamente editado para também nocautear o gene *PSEN2*, gerando a linhagem N2A-PS1/2KO-8/71, com ausência total de PS1 e PS2. Com essa ausência as células

se tornaram incapazes de produzir peptídeos A β , mas após a transfecção das formas humanas selvagens de PSEN1 e PSEN2 as células restauraram a montagem do complexo γ -secretase e a produção normal de A β 40 e A β 42. Essa restauração confirmou a viabilidade do modelo para testar mutações humanas sem interferência da atividade endógena da γ -secretase.

Em seguida, diferentes mutações conhecidas e novas foram analisadas. As mutações PSEN1 Δ Ex9 e PSEN1 L166P, associadas à forma autossômica dominante da doença de Alzheimer, mostraram o esperado aumento da razão A β 42/A β 40 e prejuízo na atividade da γ -secretase. A mutação PSEN1 V142F também aumentou a produção de A β 42, confirmando sua patogenicidade. Já as variantes no códon G206 (G206D, G206V, G206S e G206A) apresentaram efeitos variados: a mutação G206D, especificamente, reduziu os níveis totais de A β e de Pen-2, indicando comprometimento na montagem ou estabilidade do complexo γ -secretase. Por fim, entre as mutações em PSEN2, a S130L não alterou a produção de A β , sugerindo caráter não patogênico, enquanto a N141I aumentou a razão A β 42/A β 40, demonstrando patogenicidade.

Essa linhagem é importante pois permite estudar de forma mais precisa as variantes de PSEN, cujo impacto ainda não é conhecido. Para pacientes com novas variantes, essas informações são necessárias para serem incluídos em ensaios clínicos de DAAD. Coortes de pacientes com DAAD são especialmente buscadas por representarem uma forma mais homogênea da doença, com mecanismos patogênicos e biomarcadores bem estabelecidos, ao contrário do que ocorre na DA esporádica.

As alterações cognitivas, clínicas, bioquímicas e estruturais na DAAD são semelhantes às da forma esporádica da doença, o que indica mecanismos fisiopatológicos comuns. Por isso, ensaios clínicos nesse público em específico podem fornecer informações relevantes para tratamentos da DAE, que é mais prevalente (Fagan *et al.*, 2018).

Em três dos estudos analisados nesta revisão, observa-se uma perspectiva complementar sobre os mecanismos patogênicos associados a mutações no gene PSEN1. Além da humanização da APP em ratos e camundongos, no estudo de Serneels *et al.* (2020) se realizou a introdução da mutação M139T no gene PSEN1 do rato. De forma análoga, Tambini; D'Adamio (2020) criaram ratos *knock-in* com a mutação homozigota PSEN1 L435F. Ambos

tinham como objetivo avaliar as potenciais alterações patogênicas precoces causadas por essas mutações, visto que ambas estão relacionadas com as formas familiares da DA.

No estudo conduzido por Serneels et al. (2020), envolvendo a mutação *PSEN1 M139T* em ratos, observou-se que, embora a mutação alterasse o padrão de fragmentação da APP, os níveis totais de A β não foram alterados, mas houve um aumento na produção do A β 42 e uma redução de A β 40 e A β 43. No entanto, mesmo com o aumento do A β 42, os ratos portadores da mutação não desenvolveram placas amiloides nem sintomas clínicos da doença, mesmo após dois anos de idade.

Já no estudo de Tambini; D'Adamio (2020) demonstrou que embora a mutação não modulasse a expressão dos genes *PSEN1* e *PSEN2*, ela reduz a processividade enzimática. Ensaios de *western blot* realizados em ratos P4 homocigotos revelaram acúmulo de substratos da γ -secretase, enquanto os animais heterocigotos e selvagens apresentaram níveis normais. Esse acúmulo indica redução da atividade enzimática da γ -secretase, uma vez que os substratos não são eficientemente clivados. A análise da proteína PS1 mostrou atividade reduzida, especialmente nos homocigotos, sem alterações nos demais componentes do complexo, sugerindo que a mutação diminui a atividade da γ -secretase sem comprometer a expressão de suas outras subunidades.

Ao contrário do primeiro modelo, observou-se aqui uma redução de A β 38, A β 40 e A β 42, acompanhada por um aumento significativo de A β 43, tanto em valores absolutos quanto relativos, mesmo em animais com apenas um alelo mutante. Essa elevação foi evidente no cérebro de ratos *PSEN1* mutantes, em ambos os sexos e em diferentes genótipos (heterocigotos e homocigotos). Curiosamente, mesmo com essas alterações consideradas pró-patogênicas, não foram identificadas placas amiloides ou disfunções no desenvolvimento cerebral em ratos P15. A ausência de patologia amiloide no dia 15 não é surpreendente, porque em modelos transgênicos com APP mutada e superexpressa, as placas costumam surgir somente após seis meses de idade (Radde et al., 2006). Assim, os ratos *Psen1* podem requerer envelhecimento mais prolongado ou mutações adicionais para desenvolver alterações histopatológicas.

Já no estudo de Konstantinidis et al. (2022), utilizaram fibroblastos humanos portadores da mutação *PSEN1 M146L*, e demonstrou que o sistema

CRISPR-Cas9 pode corrigir seletivamente um alelo mutante sem comprometer o alelo selvagem. A redução da razão A β 42/40 após a interrupção do alelo mutante confirma que a alteração estrutural da PS1 é funcionalmente relevante para o desequilíbrio amiloidogênico, e que a modificação genética é capaz de restaurar parcialmente essa função. Além disso, a diminuição da proteína mutante e a correção parcial de sua conformação anormal reforçam a eficácia molecular da abordagem.

No entanto, uma das principais limitações na aplicação terapêutica do sistema CRISPR/Cas9 diz respeito aos efeitos fora do alvo, que correspondem a modificações genômicas não intencionais, potencialmente indesejadas ou prejudiciais, que podem comprometer tanto a segurança quanto a eficácia da intervenção (Malabarba *et al.*, 2021). Embora não tenha sido detectado *indels* em nenhum dos dez principais loci fora do alvo previstos no estudo de Konstantinidis *et al.* (2022), essa ausência de alterações não intencionais não elimina totalmente a preocupação com possíveis efeitos fora do alvo, especialmente quando se considera uma futura aplicação clínica.

Alguns dos estudos mostraram o potencial do CRISPR na modulação direta de genes associados à produção ou degradação de A β . No estudo de Yang *et al.* (2025), o *knockout* de ST6Gal-I reduziu a expressão de *BACE1*, que é uma enzima chave na geração de peptídeos A β durante a patogênese da DA (Singh; Pati, 2015). No estudo foi observado que essa enzima é fortemente expressa tanto no tecido cerebral, quanto no LCR e no soro de pacientes com DA. Esses achados sugerem que intervenções direcionadas à via de sialilação podem representar um alvo terapêutico promissor, especialmente considerando que *BACE1* é uma das principais enzimas iniciadoras da cascata amiloidogênica. A observação de que a ausência de ST6Gal-I aumenta a ubiquitinação de *BACE1* reforça a relevância do sistema ubiquitina-proteassoma no controle do metabolismo de APP, sugerindo interseção entre vias de homeostase proteica e a fisiopatologia da DA.

No eixo da inflamação, o estudo de Asanomi (2024) demonstrou que a mutação G186R na SHARPIN, introduzida por CRISPR reduz a ativação de NF- κ B e aumenta a secreção de A β 40/42 em células *HEK293*. Esses dados acrescentam camadas importantes ao entendimento das formas tardias da DA, que envolvem componentes neuroinflamatórios mais complexos. A integração

entre resultados inflamatórios e mecanismos amiloidogênicos representa um dos pontos fortes da literatura recente e reforça a ideia de que a doença emerge de interações multissistêmicas, e não de um único gatilho patológico.

O alelo APOE4 é um fator de risco significativo que contribui para o início tardio da DA. O APOE $\epsilon 4$ não só diminui a idade de início da DA, mas também favorece a patologia de A β e tau, inflamação e neurodegeneração (Xu *et al.*, 2025). O ApoE é fragmentada no cérebro humano de maneira específica para cada isoforma. Especificamente, o fragmento N-terminal de 25 kDa da apoE (apoE 25) está presente em níveis mais elevados em cérebros de apoE3 em comparação com cérebros de apoE4 (Elliott *et al.*, 2011), e a proteólise da apoE *in vitro* mediada pela enzima serina protease A1 (HtrA1) de alta temperatura é seletiva para o alelo, com aumento da fragmentação da apoE3 em comparação com a apoE4 (Chu *et al.*, 2016).

A linhagem celular de neuroblastoma SK-N-SH (APOE $\epsilon 3/3$) foi publicada como uma linhagem celular para estudar a fragmentação da apoE (Muñoz; Garner; Ooi, 2019). Em um estudo conduzido na Austrália, os pesquisadores tinham como objetivo investigar ainda mais o papel da apoE. Deste modo, a técnica CRISPR/Cas9 foi escolhida para gerar linhas celulares SK-N-SH com knockdown de APOE para comparar com as células parentais APOE $\epsilon 3/3$ SK-N-SH (Muñoz; Garner; Ooi, 2021).

Acredita-se que uma das funções específicas da apoE no cérebro seja aumentar o crescimento de neuritos de maneira específica para cada isoforma (Elliott *et al.*, 2011). A perda da ApoE agrava a disfunção cognitiva e ultraestruturais sinápticos no hipocampo de camundongos idosos (Chen, Bowei *et al.*, 2022). Em um estudo anterior, foi demonstrado que o fragmento N-terminal de 25 kDa da apoE aumenta a neurogênese em células SH-SY5Y (Muñoz *et al.*, 2018); contudo, neste estudo (Muñoz; Garner; Ooi, 2021), a ausência de apoE não afetou a proliferação celular nem o crescimento de neuritos. Essa diferença pode estar relacionada às distintas populações celulares presentes na linhagem SK-N-SH, composta por células do (tipo N) 'semelhantes a neuroblastos e (tipo S) semelhantes a epitélios, sendo que os clones compostos apenas por células do tipo N apresentaram expressão mínima de APOE, indicando que a apoE é preferencialmente expressa pelas células do tipo S.

Com base nesses resultados, parece que a apoE pode ser expressa por

células do tipo S, que apresentam um fenótipo mais epitelial, e não pelas células neuroblásticas, como também demonstrado por Muñoz et al. (2018). Diante disso, eles hipotetizaram que pode haver diferenças na expressão mediadas pela presença de distintos tipos celulares nas populações de células *SK-N-SH* e que se deve-se ter cautela ao considerar a interpretação experimental ou a escolha dessas células como modelo para aplicações em neurociência e que há necessidade de mais experimentos para identificar se a apoE afeta a transdiferenciação de células do tipo N e do tipo S.

Além desses achados, observou-se que a redução de *APOE* foi acompanhada por uma diminuição da expressão de *HTRA1*, sugerindo que a apoE pode regular positivamente a HtrA1. Nas doenças neurodegenerativas, a HTRA1 participa da degradação das fibrilas de tau e, em extratos cerebrais de pacientes com DA os níveis reduzidos de HTRA1 estão associados a maior acúmulo de emaranhados neurofibrilares (Hagemeier et al., 2025).

Uma possibilidade é que, em circunstâncias normais, as células neuronais (como modelado pelo tipo N nas células *SK-N-SH*, como o clone 2 no presente estudo ou as células *SH-SY5Y*) apresentem níveis baixos ou nulos de HtrA1. No entanto, quando a apoE está presente, ocorre uma regulação positiva na expressão de HtrA1 e, conseqüentemente, na apoE 25. Estudos adicionais são necessários para compreender a ligação entre a expressão de HtrA1 e apoE e a perda da neuroproteção quando os níveis de apoE estão reduzidos ou ausentes; os clones com expressão reduzida de *APOE* podem ser utilizados para tais estudos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análise integrada dos estudos demonstrou que o uso da tecnologia CRISPR-Cas9 representa um avanço decisivo para a pesquisa da doença de Alzheimer, ao possibilitar a geração de modelos experimentais mais próximos do contexto fisiológico humano, no teste funcional de mutações humanas e na manipulação dirigida de vias patológicas específicas.

No entanto, há uma convergência importante, pois todos os modelos editados reproduziram aspectos isolados da doença, mas nenhum modelo *in vivo* reproduziu a neurodegeneração progressiva completa observada em humanos, o que evidencia que modelos genéticos isolados não são capazes de capturar todo o fenótipo da enfermidade. Apesar dessas limitações, os progressos consolidam que a edição genética é uma ferramenta essencial para aprofundar a compreensão dos mecanismos da doença e orientar estratégias de intervenção mais precisas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Fayyaz; JAVED, Muqaddas; ATHAR, Muhammad; SHAHZADI, Samra. Determination of affected brain regions at various stages of Alzheimer's disease. **Neuroscience Research**, [s. l.], vol. 192, p. 77–82, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.01.010>.

ARBER, C.; VILLEGAS-LLERENA, C.; TOOMBS, J.; POCOOCK, J. M.; RYAN, N. S.; FOX, N. C.; ZETTERBERG, H.; HARDY, J.; WRAY, S. Amyloid precursor protein processing in human neurons with an allelic series of the PSEN1 intron 4 deletion mutation and total presenilin-1 knockout. **Brain Communications**, v. 1, n. 1, p. fc2024, 2019. DOI: 10.1093/braincomms/fcz024

ASANOMI, Y.; KIMURA, T.; SHIMODA, N.; SHIGEMIZU, D.; NIIDA, S.; OZAKI, K. CRISPR/Cas9-mediated knock-in cells of the late-onset Alzheimer's disease-risk variant, SHARPIN G186R, reveal reduced NF- κ B pathway and accelerated A β secretion. **Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 5, p. 171–176, 2024. DOI: 10.1038/s10038-024-01224-x.

ASHRAFIAN, Hossein; ZADEH, Elaheh Hadi; KHAN, Rizwan Hasan. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], vol. 167, p. 382–394, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.192>.

BARAGE, Sagar H.; SONAWANE, Kailas D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, [s. l.], vol. 52, p. 1–18, 2015. .

BHARDWAJ, Shanu; KESARI, Kavindra Kumar; RACHAMALLA, Mahesh; MANI, Shalini; ASHRAF, Ghulam Md; JHA, Saurabh Kumar et al. CRISPR/Cas9 gene editing: New hope for Alzheimer's disease therapeutics.

Journal of Advanced Research, [s. l.], vol. 40, p. 207–221, 2022. DOI 10.1016/j.jare.2021.07.001. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.07.001>.

BLUMENFELD, Jessica; YIP, Oscar; KIM, Min Joo; HUANG, Yadong. Cell type-specific roles of APOE4 in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], vol. 25, no. 2, p. 91–110, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00776-9>.

BREIJYEH, Zeinab; KARAMAN, Rafik. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. **Molecules**, [s. l.], vol. 25, no. 24, 2020. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>.

CHEN, B.; YI, J.; XU, Y.; WEN, H.; TIAN, F.; LIU, Y.; XIAO, L.; LI, L.; LIU, B. Apolipoprotein E knockout may affect cognitive function in D-galactose-induced aging mice through the gut microbiota – brain axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 939915, 2022. DOI: 10.3389/fnins.2022.939915.

CHEN, Minjiang; MAO, Aiwu; XU, Min; WENG, Qiaoyou; MAO, Jianting; JI, Jiansong. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. **Cancer Letters**, [s. l.], vol. 447, p. 48–55, 2019. .

CHU, Qian; DIEDRICH, Jolene K; VAUGHAN, Joan M; DONALDSON, Cynthia J; MICHAEL, F. HtrA1 Proteolysis of ApoE in vitro is Allele Selective. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], , p. 1–22, 2016.

CIUREA, Vlad Alexandru; COVACHE-BUSUIOC, Razvan Adrian; MOHAN, Aurel George; COSTIN, Horia Petre; VOICU, Victor. Alzheimer's disease: 120 years of research and progress. **Journal of Medicine and Life**, [s. l.], vol. 2023, no. 2, p. 173–177, 2023. <https://doi.org/10.25122/jml-2022-0111>.

CLEVENGER, Carolyn K.; LINGLER, Jennifer H.; ZHANG, Yuchen; SELERI, Sheila; PARNAS, M. Laura; YOUMANS-KIDDER, Katherine. Role of nurse practitioners in comprehensive alzheimer's disease care: Barriers and opportunities for timely diagnosis. **Geriatric Nursing**, [s. l.], vol. 61, p. 400–407, 2025. DOI 10.1016/j.gerinurse.2024.11.020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2024.11.020>.

DONG, Kangli; LIANG, Wei; HOU, Ting; LU, Zhijie; HAO, Yixuan; LI, Chenrui; QIU, Yue; KONG, Nan; CHENG, Yan; WEN, Yaqi; MA, Wanyin; ZHENG, Wenbin; GUAN, Jitian; LIN, Yan; HUANG, Kai; ZHANG, Lu; CHEN, Siya; MA, Xiangyuan; WU, Renhua; WEI, Naili. Exploring the impact of APOE ϵ 4 on functional connectivity in Alzheimer's disease across cognitive impairment levels. **NeuroImage**, [s. l.], vol. 305, no. September 2024, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2024.120951>.

ELLIOTT, David A.; TSOI, Kayan; HOLINKOVA, Sandra; CHAN, Sharon L.; KIM, Woojin S. et al. Isoform-specific proteolysis of apolipoprotein-E in the brain. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], vol. 32, no. 2, p. 257–271, 2011. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.006>.

FAGAN, Anne M; FANNING, Kathleen; FARLOW, Martin R; HASSENSTAB, Jason. The DIAN-TU Next Generation Alzheimer's prevention trial: Adaptive design and disease progression model. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 1, p. 8–19, 2017. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.07.005.

FAN, Jialing; TAO, Wuhai; LI, Xin; LI, He; ZHANG, Junying; WEI, Dongfeng et al. The contribution of genetic factors to cognitive impairment and dementia: Apolipoprotein E gene, gene interactions, and polygenic risk. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 20, no. 5, p. 1–31, 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20051177>.

FERNÁNDEZ-CALLE, Rosalía; KONINGS, Sabine C.; FRONTIÑÁN-RUBIO, Javier; GARCÍA-REVILLA, Juan; CAMPRUBÍ-FERRER, Lluís et al. APOE in the bullseye of neurodegenerative diseases: impact of the APOE genotype in Alzheimer's disease pathology and brain diseases. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], vol. 17, no. 1, p. 1–47, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00566-4>.

FERNANDEZ, Maria Victoria; LIU, Menghan; BERIC, Aleksandra; JOHNSON, Matt; CETIN, Arda et al. Genetic and multi-omic resources for Alzheimer disease and related dementia from the Knight Alzheimer Disease Research Center. **Scientific Data**, [s. l.], vol. 11, no. 1, p. 1–19, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03485-9>.

FLOWERS SA, Rebeck GW. APOE in the Normal Brain. **Neurobiol Dis**, [s. l.], vol. 176, no. 1, p. 100–106, 2020. <https://doi.org/10.1177/0022146515594631.Marriage>.

GLEDITZSCH, Daniel; PAUSCH, Patrick; MÜLLER-ESPARZA, Hanna; ÖZCAN, Ahsen; GUO, Xiaohan; BANGE, Gert. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes : diversified mechanisms and structures. **RNA Biology**, [s. l.], vol. 16, no. 4, p. 504–517, 2019. DOI 10.1080/15476286.2018.1504546. Available at: <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546>.

GUO, C.; MA, X.; GAO, F.; GUO, Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1143157, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1143157.

HAGEMEIER, Birte; RIPKENS, Kamilla; SCHULZE, Nina; BLUEMKE, Anika; STRZALA, Michal et al. The serine protease HTRA1 targets tau fibrils and

provides a proteolytic barrier against pathogenic protein conformations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 301, n. 10, p. 110729, 2025. DOI: 10.1016/j.jbc.2025.110729.

HAMPEL, Harald; HARDY, John; BLENNOW, Kaj; CHEN, Christopher; PERRY, George et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], vol. 26, no. 10, p. 5481–5503, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.

HUNG, Christy; FERTAN, Emre; LIVESEY, Frederick J.; KLENERMAN, David; PATANI, Rickie. APP antisense oligonucleotides reduce amyloid- β aggregation and rescue endolysosomal dysfunction in Alzheimer's disease. **Brain**, [s. l.], vol. 147, no. 7, p. 2325–2333, 2024. <https://doi.org/10.1093/brain/awae092>.

JIANG, Haibin; TANG, Mengyan; XU, Zidi; WANG, Yanan; LI, Mopu et al. CRISPR/Cas9 system and its applications in nervous system diseases. **Genes and Diseases**, [s. l.], vol. 11, no. 2, p. 675–686, 2024. DOI 10.1016/j.gendis.2023.03.017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.03.017>.

JINEK, Martin; CHYLINSKI, Krzysztof; FONFARA, Ines; HAUER, Michael; JENNIFER, A. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829.

KHAN, Mohamad Sultan; QURESHI, Nousheen; KHAN, Rehan; SON, Young Ok; MAQBOOL, Tariq. CRISPR/Cas9-Based therapeutics as a promising strategy for management of Alzheimer's disease: progress and prospects. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], vol. 19, no. April, p. 1–22, 2025. <https://doi.org/10.3389/fncel.2025.1578138>.

KHAN, Sahil; BARVE, Kalyani H.; KUMAR, Maushmi S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], vol. 18, no. 11, p. 1106–1125, 2020. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200528142429>.

KONSTANTINIDIS, Evangelos; MOLISAK, Agnieszka; PERRIN, Florian; STREUBEL-GALLASCH, Linn; FAYAD, Sarah et al. CRISPR-Cas9 treatment partially restores amyloid- β 42/40 in human fibroblasts with the Alzheimer's disease PSEN1 M146L mutation. **Molecular Therapy – Nucleic Acids**, v. 28, p. 450–461, 2022. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.03.022.

KRISHNAMURTHY, Hari Krishnan; JAYARAMAN, Vasanth; KRISHNA, Karthik; WANG, Tianhao; BEI, Kang et al. An overview of the genes and biomarkers in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], vol. 104, no. September 2024, p. 102599, 2025. DOI 10.1016/j.arr.2024.102599. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102599>.

KUMAR, A.; SIDHU, J.; LUI, F.; TSAO, J. W. **Alzheimer disease**. In: *StatPearls* [Internet]. [s. l.], p. 1–20, 2024.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, [s. l.], vol. 25, no. 1, p. 59–70, 2018. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.

LESSARD, Christian B.; RODRIGUEZ, Edgardo; LADD, Thomas B.; MINTER, Lisa M.; OSBORNE, Barbara A. et al. Individual and combined presenilin 1 and 2 knockouts reveal that both have highly overlapping functions in HEK293T cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 294, no. 29, p. 11276–11285, 2019. DOI 10.1074/jbc.RA119.008041. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA119.008041>.

LU, Likui; YU, Xi; CAI, Yongle; SUN, Miao; YANG, Hao. Application of CRISPR/Cas9 in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], vol. 15, no. December, p. 1–14, 2021. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.803894>.

MALABARBA, Jaiana; CHEVREAU, Elisabeth; DOUSSET, Nicolas; VEILLET, Florian; MOIZAN, Julie; VERGNE, Emilie. New strategies to overcome present CRISPR/Cas9 limitations in apple and pear: Efficient dechimerization and base editing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 319, 2020. DOI: 10.3390/ijms22010319.

MICHA, Renata; Convergent genetic and expression data implicate immunity in Alzheimer's disease. **Physiology & behavior**, [s. l.], vol. 176, no. 1, p. 100–106, 2017. <https://doi.org/10.1177/0022146515594631>.Marriage.

MOSSELLO, Enrico; BALLINI, Elena. Management of patients with Alzheimer's disease: Pharmacological treatment and quality of life. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, [s. l.], vol. 3, no. 4, p. 183–193, 2012. <https://doi.org/10.1177/2040622312452387>.

MUÑOZ, Sonia Sanz; GARNER, Brett; OOI, Lezanne. Generation of APOE knock-down SK-N-SH human neuroblastoma cells using CRISPR/Cas9: a novel cellular model relevant to Alzheimer's disease research. **Bioscience Reports**, vol. 41, n. 2, p. 1–22, 2021. DOI: 10.1042/BSR20204243.

MUÑOZ, Sonia Sanz; GARNER, Brett; OOI, Lezanne. Understanding the Role of ApoE Fragments in Alzheimer ' s Disease. **Neurochemical Research**, [s. l.], vol. 44, no. 6, p. 1297–1305, 2019. DOI 10.1007/s11064-018-2629-1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-018-2629-1>.

MUÑOZ, Sonia Sanz; LI, Hongyun; RUBERU, Kalani; CHU, Qian; SAGHATELIAN, Alan; OOI, Lezanne; GARNER, Brett. c The serine protease

HtrA1 contributes to the formation of an extracellular 25-kDa apolipoprotein E fragment that stimulates neuritogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 11vol. 293, p. 4071–4084, 2018.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001278>.

NAEEM, Muhammad; MAJEED, Saman; HOQUE, Mubasher Zahir; AHMAD, Irshad. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. [s. l.], , p. 1–23, 2020.

OVCHINNIKOV, Dmitry A.; KORN, Othmar; VIRSHUP, Isaac; WELLS, Christine A.; WOLVETANG, Ernst J. The Impact of APP on Alzheimer-like Pathogenesis and Gene Expression in Down Syndrome iPSC-Derived Neurons. **Stem Cell Reports**, [s. l.], vol. 11, no. 1, p. 32–42, 2018. DOI 10.1016/j.stemcr.2018.05.004. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.004>.

PANDEY, Gaurav; RAMAKRISHNAN, Vibin. Invasive and non-invasive therapies for Alzheimer's disease and other amyloidosis. **Biophysical Reviews**, [s. l.], vol. 12, no. 5, p. 1175–1186, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00752-y>.

PANG, Keliang; JIANG, Richeng; ZHANG, Wei; YANG, Zhengyi; LI, Lin-lin et al. An App knock-in rat model for Alzheimer's disease exhibiting A β and tau pathologies, neuronal death and cognitive impairments. **Cell Research**, v. 32, n. 2, p. 157–175, 2022. DOI: 10.1038/s41422-021-00582-x.

PERLUIGI, Marzia; DI DOMENICO, Fabio; BUTTERFIELD, D. Allan. Oxidative Damage in Neurodegeneration: Roles in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer Disease. **Physiological Reviews**, [s. l.], vol. 104, no. 1, p. 103–197, 2024. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2022>.

PIMENOVA, Anna A; GOATE, Alison M. Novel presenilin 1 and 2 double knock-out cell line for in vitro validation of PSEN1 and PSEN2 mutations.

Neurobiology of Disease, vol. 138, p. 104785, 2020. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.104785.

PLANO, Laura M De; CALABRESE, Giovanna; CONOCI, Sabrina; GUGLIELMINO, Salvatore P P; ODDO, Salvatore; CACCAMO, Antonella. Applications of CRISPR-Cas9 in Alzheimer's disease and related disorders.

International Journal of Molecular Sciences, vol. 23, n. 15, p. 8714, 2022. DOI: 10.3390/ijms23158714. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23158714>

RADDE, Rebecca; BOLMONT, Tristan; KAESER, Stephan A.; COOMARASWAMY, Janaky; LINDAU, Dennis et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. **EMBO Reports**, vol. 7, n. 9, p. 940–946, 2006. DOI: 10.1038/sj.embor.7400784. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400784>

RAO, Y. Lakshmisha; GANARAJA, B.; MURLIMANJU, B. V.; JOY, Teresa; KRISHNAMURTHY, Ashwin; AGRAWAL, Amit. Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. **3 Biotech**, [s. l.], vol. 12, no. 2, p. 1–10, 2022. DOI 10.1007/s13205-022-03123-4. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>.

RIBEIRO, Helem F.; DOS SANTOS, Jéssica Scarlet F.; DE SOUZA, Julyanne N. Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP): características neuropatológicas e variantes genéticas associadas. **Revista de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], vol. 84, no. 2, p. 113–127, 2021. <https://doi.org/10.20453/rnp.v84i2.3998>.

ROSTAGNO, Agueda A. Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease. [s. l.], 2023. .
SCHRAUBEN, Michael; DEMPSTER, Emma; LUNNON, Katie. Applying gene-

editing technology to elucidate the functional consequence of genetic and epigenetic variation in Alzheimer's disease. **Brain Pathology**, [s. l.], vol. 30, no. 5, p. 992–1004, 2020. <https://doi.org/10.1111/bpa.12881>.

SASAGURI, H. *et al.* APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. **EMBO Journal**, v. 36, n. 17, p. 2473–2487, 2017. DOI: 10.15252/embj.201797397.

SERNEELS, Lutgarde; T'SYEN, Dries; PEREZ-BENITO, Laura; THEYS, Tom; HOLT, Matthew G.; DE STROOPER, Bart. Modeling the β -secretase cleavage site and humanizing amyloid-beta precursor protein in rat and mouse to study Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], vol. 15, no. 1, p. 494–505, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00399-z>.

SINGH, A. K.; PATI, U. CHIP stabilizes amyloid precursor protein via proteasomal degradation and p53-mediated trans-repression of β -secretase. **Aging Cell**, v. 14, n. 4, p. 595–604, 2015. DOI: 10.1111/accel.12335. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12335>

SONI, Nilay; KAR, Indrani; NARENDRASINH, Jadav Dhruvkumar; SHAH, Sanjay Kumar; KONATHALA, Lohini *et al.* Role and application of CRISPR-Cas9 in the management of Alzheimer's disease. **Annals of Medicine & Surgery**, [s. l.], vol. 86, no. 3, p. 1517–1521, 2024. <https://doi.org/10.1097/ms9.0000000000001692>.

STROOPERL, Bart De; SIMONS, Mikael; MULTHAUP, Gerd; LEUVEN, Fred Van; BEYREUTHER, Konrad; DOTTI, Carlos G. Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. **EMBO Journal**, v. 14, n. 20, p. 4932–4938, 1995. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00176.x. Available at:

<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00176.x>.

SUN, Yu Ying; WANG, Zhun; HUANG, Han Chang. Roles of ApoE4 on the Pathogenesis in Alzheimer's Disease and the Potential Therapeutic Approaches. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], vol. 43, no. 7, p. 3115–3136, 2023. DOI 10.1007/s10571-023-01365-1. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01365-1>.

TAMBINI, Marc D.; D'ADAMIO, Luciano. Knock-in rats with homozygous PSEN1L435F Alzheimer mutation are viable and show selective γ -secretase activity loss causing low A β 40/42 and high A β 43. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 295, no. 21, p. 7442–7451, 2020. DOI 10.1074/jbc.RA120.012542. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.012542>.

VALDEZ-GAXIOLA, César A.; ROSALES-LEYCEGUI, Frida; GAXIOLA-RUBIO, Abigail; MORENO-ORTIZ, José Miguel; FIGUERA, Luis E. Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease: Two Sides of the Same Coin? **Diseases**, [s. l.], vol. 12, no. 6, 2024. <https://doi.org/10.3390/diseases12060110>.

XU, Xiaoyi; KWON, Jiseon; YAN, Ruiqi; APIO, Catherine; SONG, Soomin et al. Sex Differences in Apolipoprotein E and Alzheimer Disease Pathology Across Ancestries. **JAMA network open**, [s. l.], vol. 8, no. 3, p. e250562, 2025. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2025.0562>.

YANG, Kangkang; LI, Xueying; LAI, Minchao; ZHAO, Weiwei; SONG, Wanli; CHEN, Shaobin; LI, Wenzhe. Ablation of ST6Gal-I Downregulates BACE1 Expression and Suppresses Production of A β 42 Plaques in Alzheimer's Disease. **Engineering**, [s. l.], vol. 1, no. xxxx, 2025. DOI 10.1016/j.eng.2025.02.016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2025.02.016>.

ZHANG, Huiqin; WEI, Wei; ZHAO, Ming; MA, Lina; JIANG, Xuefan et al.
Interaction between A β and Tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease.
International Journal of Biological Sciences, vol. 17, n. 9, p. 2181–2192,
2021. DOI: 10.7150/ijbs.57078. Available at: <https://doi.org/10.7150/ijbs.57078>.

ZHAO, Jing; LIU, Xinyue; XIA, Weiming; ZHANG, Yingkai; WANG, Chunyu.
Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. **Frontiers
in Molecular Neuroscience**, [s. l.], vol. 13, no. August, 2020.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137>.

ZHONG, Michael Z; PENG, Thomas; DUARTE, Mariana Lemos; WANG,
Minghui. Updates on mouse models of Alzheimer ' s disease. **Molecular
Neurodegeneration**, [s. l.], , p. 1–33, 2024. DOI 10.1186/s13024-024-00712-0.
Available at: <https://doi.org/10.1186/s13024-024-00712-0>.