

**TERAPIA GÉNICA PRÉ-NATAL:  
EVOLUÇÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

Carolina Jorge Veiga

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**  
Professora Doutora Vera Linda Ribeiro Marques

2023



**TERAPIA GÉNICA PRÉ-NATAL:  
EVOLUÇÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

Carolina Jorge Veiga

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**  
Professora Doutora Vera Linda Ribeiro Marques

2023



# Terapia Génica Pré-natal: Evolução e Perspetivas Futuras

## **Declaração de autoria de trabalho:**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

Faro, novembro de 2023

*Copyright*© Carolina Veiga

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Vera Ribeiro pela orientação e disponibilidade ao longo da escrita desta dissertação.

Queria agradecer aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim.

Às minhas amigas Margarida e Daniela pelo apoio e motivação.

Às amigas que me acompanharam durante esta etapa de 5 anos e sem as quais a mesma não seria igual, Carolina, Mariana e Catarina.

Por último, a todos os que fizeram parte deste percurso, um muito obrigada!



## Resumo

As anomalias congênitas podem resultar em aborto, morte prematura ou incapacidade ao longo da vida, constituindo assim um grave problema de saúde pública. A capacidade de diagnosticar certas condições cada vez mais precocemente remete para uma potencial intervenção antes do nascimento e da irreversibilidade da patologia.

A terapia génica pré-natal surge como uma terapêutica promissora no tratamento de doenças monogénicas ou outras condições maternas que afetem negativamente o feto e resultem em morbidade e/ou mortalidade *in utero* ou após o nascimento. Esta apresenta múltiplas vantagens comparativamente à realização de uma terapia génica pós-natal, uma vez que permite tirar partido das propriedades inerentes ao desenvolvimento fetal. Uma única administração de uma terapia génica antes do nascimento poderia, assim, possibilitar uma boa qualidade de vida ao indivíduo, ao fornecer uma expressão transgénica ao longo da vida, o que se traduziria consequentemente em benefícios a nível económico e social.

Contudo, apesar de ainda se encontrar na sua “infância”, diversos estudos pré-clínicos têm vindo a ser realizados nas últimas décadas, de modo a verificar o seu potencial terapêutico e segurança, quer para o feto como para a progenitora. Algumas das doenças que poderiam beneficiar de tal terapêutica seriam, entre outras, a atrofia muscular espinal, doenças lisossomais de sobrecarga, hemofilia, hemoglobinopatias e doenças pulmonares monogénicas.

Neste âmbito, a presente dissertação tem como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica relativa à terapia génica pré-natal, à sua evolução e estado atual, bem como vantagens e barreiras à sua implementação. Serão também analisados os diferentes sistemas de entrega e estratégias terapêuticas que poderão ser utilizados neste período de modo a alcançar o objetivo pretendido. Além disto, serão abordados estudos pré-clínicos realizados ao longo dos anos em diferentes modelos animais com vista a averiguar a segurança e eficácia da mesma.

**Palavras-chave:** Terapia génica pré-natal, Feto, Vetores virais e não virais, Edição Génica *in utero*, Medicina Materno-Fetal, Diagnóstico Pré-natal.



## Abstract

Congenital abnormalities can result in miscarriage, premature death or lifelong disability, thus constituting a serious public health problem. The ability to diagnose certain conditions at an increasingly earlier age leads to a potential intervention before birth and pathology irreversibility.

Prenatal gene therapy appears as a promising therapeutic in the treatment of monogenic diseases or other maternal conditions that negatively affect the fetus and result in morbidity and/or mortality *in utero* or after birth. This has multiple advantages compared to postnatal gene therapy, as it allows taking advantage of the properties inherent to fetal development. A single administration of gene therapy before birth could, therefore, provide a good quality of life for the individual, by providing a transgenic expression throughout life, which would consequently translate into economic and social benefits.

However, despite still being in its “infancy”, several pre-clinical studies have been carried out in the last decades, to examine its therapeutic potential and safety, both for the fetus and the mother. Some of the diseases that could benefit from such therapy would be, among others, spinal muscular atrophy, lysosomal storage diseases, hemophilia, hemoglobinopathies and monogenic lung diseases.

In this context, this dissertation aims to present a bibliographical review regarding prenatal gene therapy, its evolution and current status, as well as advantages and barriers to its implementation. The different delivery systems and therapeutic strategies that could be used during this period in order to achieve the desired purpose will also be analyzed. In addition, pre-clinical studies carried out over the years in different animal models will be discussed in order to examine its safety and effectiveness.

**Keywords:** Prenatal gene therapy, Fetus, Viral and non-viral vectors, *In utero* Gene Editing, Maternal-Fetal Medicine, Prenatal Diagnosis.



# Índice Geral

<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice Geral</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. História da Terapia Génica e da Terapia génica Pré-natal</b> .....	<b>3</b>
<b>3. O conceito de Terapia Génica</b> .....	<b>7</b>
3.1. Terapia Génica Pré-natal .....	8
3.1.1. O Fundamento .....	8
3.1.2. Os Tipos de Terapia Génica Pré-natal .....	10
a) Terapia Génica Pré-natal <i>Ex Vivo</i> .....	10
b) Terapia Génica Pré-natal Somática Direta .....	11
c) Terapia Génica Materna .....	12
3.1.3. Vantagens da Terapia Génica Pré-natal .....	14
a) O tamanho do feto .....	14
b) A imaturidade imunológica do feto .....	14
c) Acessibilidade e natureza proliferativa de células estaminais ou progenitoras de múltiplos órgãos .....	15
d) Permeabilidade da barreira hematoencefálica .....	16
<b>4. Entrega da Terapia Génica ao Feto</b> .....	<b>17</b>
4.1. Sistemas de entrega .....	18
4.1.1. Sistemas de Entrega Virais .....	18
a) Retrovírus .....	19
b) Lentivírus .....	21
c) Adenovírus .....	23
d) Vírus Adeno-Associados .....	25
4.1.2. Sistemas de Entrega Não-Virais .....	27
a) Sistemas de Entrega Não-Virais Físicos .....	27

b) Sistemas de Entrega Não-Virais Químicos .....	29
<b>5. Estratégias Terapêuticas .....</b>	<b>31</b>
5.1. Transferência de Genes .....	31
5.2. Silenciamento de Genes .....	32
5.2.1. RNA de Interferência (RNAi) .....	32
5.2.2. Oligonucleotídeos Antisense (ASO) .....	34
5.3. Edição de Genes .....	36
5.3.1. Nucleases Dedos de Zinco (ZFNs) .....	38
5.3.2. TALENs .....	38
5.3.3. CRISPR/Cas9 .....	39
5.3.3.1. Edição de Genes no Período Pré-natal .....	40
<b>6. Doenças Candidatas à Terapia Génica Pré-natal .....</b>	<b>47</b>
6.1. Doenças Neuromusculares .....	48
6.1.1. Atrofia Muscular Espinal .....	48
6.2. Doenças Lisossomais de Sobrecarga .....	52
6.2.1. Mucopolissacaridoses .....	52
6.2.2. Doença de Gaucher .....	56
6.3. Hemofilia .....	57
6.4. Hemoglobinopatias .....	62
6.5. Doenças Pulmonares Monogénicas .....	63
6.5.1. Fibrose Cística .....	63
6.5.2. Síndromes de Disfunção da Proteína Surfactante .....	65
<b>7. Considerações de Segurança .....</b>	<b>67</b>
<b>8. Considerações Éticas .....</b>	<b>69</b>
<b>9. Conclusão .....</b>	<b>71</b>
<b>10. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>73</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 3.1.</b> – <i>Representação esquemática da terapia génica pré-natal ideal.</i> Adaptado de (52) .....	9
<b>Figura 3.2.</b> – <i>Representação dos diferentes tipos de terapia génica pré-natal.</i> Adaptado de (9).....	13
<b>Figura 3.3.</b> – <i>Representação das vantagens da terapia génica pré-natal.</i> Adaptado de (49) .....	16
<b>Figura 4.1.</b> – <i>Representação do genoma de um gamma-retrovírus e de um lentivírus.</i> Adaptado de (87) .....	21
<b>Figura 4.2.</b> – <i>Representação esquemática de um vetor baseado em lentivírus de terceira geração.</i> Adaptado de (99) .....	23
<b>Figura 4.3.</b> – <i>Representação da organização genómica de um adenovírus do serotipo 5 (Ad5) e das diferentes gerações de vetores.</i> Adaptado de (103) .....	24
<b>Figura 4.4.</b> – <i>Representação esquemática do genoma de um AAV e vetor viral derivado.</i> Adaptado de: (99) .....	26
<b>Figura 5.1.</b> – <i>Representação da transferência de genes por substituição (A) e por adição (B).</i> Adaptado de (126) .....	31
<b>Figura 5.2.</b> – <i>Representação esquemática de três vias do mecanismo de RNA interferência.</i> Adaptado de (131).....	33
<b>Figura 5.3.</b> – <i>Representação dos mecanismos de ação dos ASOs.</i> Adaptado de (137) ..	35
<b>Figura 5.4.</b> – <i>Tipos de nucleases utilizadas na edição genética e os diferentes mecanismos de reparação do DNA do hospedeiro.</i> Adaptado de (153) .....	37
<b>Figura 5.5.</b> – <i>Edição génica in utero melhora fenótipo de uma patologia pulmonar.</i> Adaptado de (173) .....	42
<b>Figura 5.6.</b> – <i>Resultados obtidos após administração intravenosa de nanopartículas <math>\gamma</math>PNA/DNA em fetos de murganhos com <math>\beta</math>-talassémia, no dia de gestação 15.5.</i> Adaptado de (76) .....	44

<b>Figura 6.1.</b> – <i>Exemplos de doenças candidatas à terapia génica pré-natal. Adaptado de (3)</i> .....	48
<b>Figura 6.2.</b> – <i>Representação da administração da terapia génica in utero via intracerebroventricular (ICV). Adaptado de (181)</i> .....	50
<b>Figura 6.3.</b> – <i>Tratamento pré-natal de fetos de murgancho SMA com rAAV9-SMN resgatou a perda de neurónios motores e preveniu a atrofia muscular ao dia pós-natal 14 (P14). Adaptado de (181)</i> .....	51
<b>Figura 6.4.</b> – <i>Resultados da edição de bases in utero nos murganhos Idua-W392X MPS-IH, aos 6 meses de idade. Adaptado de (190)</i> .....	55
<b>Figura 6.5.</b> – <i>Níveis de expressão de hFIX em modelos animais tratados com AAV8-hFIX ou AAV5-hFIX, no final da gestação (0.9G). Adaptado de (204)</i> .....	60
<b>Figura 6.6.</b> – <i>Níveis de expressão de hFIX em modelos animais tratados com AAV5-hFIX ou AAV8-hFIX. Adaptado de (112)</i> .....	61

## Lista de Abreviaturas

**AAP** - Proteína de Ativação de Montagem, do inglês *Assembly Activating Protein*

**AAV** - Vírus Adeno-Associado, do inglês *Adeno-Associated Virus*

**ABCA3** – Transportador Transmembranar da família ABC, do inglês *Adenosine Triphosphate Binding Cassette Protein Member 3*

**Ad** - Adenovírus, do inglês *adenovirus*

**ADA** - Adenosina Desaminase, do inglês *Adenosine Deaminase*

**ADA-SCID** - Imunodeficiência Combinada Grave por Deficiência de Adenosina Desaminase, do inglês *Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency*

**AEC2s** - Células epiteliais alveolares tipo 2, do inglês *Alveolar Epithelial Type 2 Cells*

**ASOs** - Oligonucleotídeos *Antisense*, do inglês *Antisense Oligonucleotides*

**BHE** - Barreira Hematoencefálica

**Bp** – Pares de bases, do inglês *Base pairs*

**CFDA** - *China Food and Drug Administration*

**CFTR** - Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística, do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

**CRISPR** - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

**crRNA** - CRISPR RNA

**DNA**- Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

**dsDNA** - DNA de cadeia dupla, do inglês *double-stranded DNA*

**EMA** - Agência Europeia do Medicamento, do inglês *European Medicines Agency*

**ERT** - Terapia de Reposição Enzimática, do inglês *Enzyme Replacement Therapy*

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**FGR** - Restrição de crescimento fetal, do inglês *Fetal growth restriction*

**GAGs** – Glicosaminoglicanos, do inglês *Glycosaminoglycans*

**GFP** - *Green Fluorescent Protein*

**GTAC** - *Gene Therapy Advisory Committee*

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

**HNSCC** - Carcinoma de Células Escamosas da Cabeça e do Pescoço, do inglês *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*

**HPD** - 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase

**HR** - Recombinação Homóloga, do inglês *Homologous Recombination*

**HSC** - Células Estaminais Hematopoiéticas, do inglês *Hemopoietic Stem Cell*

**HSCT** - Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas, do inglês *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*

**HT1**- Tirosinemia Hereditária Tipo 1, do inglês *Hereditary Tyrosinemia Type I*

**ICV** - Intracerebroventricular

**IFeTIS** - Sociedade Internacional de Transplante Fetal e Imunologia, do inglês *International Fetal Transplantation and Immunology Society*

**ITRs** - Repetições Terminais Invertidas, do inglês *Inverted Terminal Repeats*

**kb** – Quilobase, do inglês *Kilobase*

**LNA** - Ácido Nucleico Bloqueado, do inglês *Locked Nucleic Acid*

**LP1** - *Liver-specific Promoter 1*

**LSDs** - Doenças Lisossomais de Sobrecarga, do inglês *Lysosomal Storage Diseases*

**LTR** - Longas Sequências Repetitivas, do inglês *Long Terminal Repeats*

**LV** – Lentivírus

**MALAT1** - do inglês, *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*

**miRNA** - do inglês, *microRNA*

**MLV** - Vírus da Leucemia Murina, do inglês *Murine Leukemia Virus*

**MPS** - Mucopolissacaridoses

**nGD** - doença de Gaucher neuropática aguda, do inglês *acute neuronopathic Gaucher Disease*

**NHEJ** - União de Extremidades Não Homólogas, do inglês *Non-Homologous End Joining*

**NIH RAC** - *US National Institute for Health Recombinant DNA Advisory Committee*

**NIPT** - Teste Não Invasivo Pré-natal, do inglês *Non Invasive Prenatal Test*

**OTC** - Ornitina Transcarbamilase, do inglês *Ornithine Transcarbamylase*

**PAM** - *Protospacer Adjacent Motif*

**PBS** - *Primer Binding Site*

**PEI** - Polietilenoimina, do inglês *Polyethyleneimine*

**PLGA** – Poli (ácido láctico-co-glicólico), do inglês *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*

**PLL** - Poli-L-lisina

**PMOs** - Oligómeros morfolino fosforodiamidato, do inglês *Phosphorodiamidate morpholino oligomer*

**PNAs** - Ácidos Nucleicos Peptídicos, do inglês *Peptide nucleic acid*

**PPT** - Trato de Polipurina, do inglês *Polypurine Tract*

**pré-miRNA** - miRNA precursor

**pri-miRNA** - miRNA primário

**rDNA** - DNA recombinante, do inglês *recombinant DNA*

**RISC** - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA, do inglês *RNA Induced Silencing Complex*

**RNA**- Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

**RNAi** - RNA de interferência, do inglês *Interference RNA*

**Rnase H**- Ribonuclease H

**RVDs** - Diresíduos Variáveis de Repetição, do inglês *Repeat-Variable Di-residues*

**SCID-X1** - Imunodeficiência Combinada Severa ligada ao X, do inglês *X-linked Severe Combined Immunodeficiency*

**SDR** - Síndrome de Dificuldade Respiratória

**sgRNA** - RNA guia único

**shRNA** - *short hairpin RNA*

**siRNA** - *short interfering RNA*

**SMA** - Atrofia Muscular Espinal, do inglês *Spinal muscular atrophy*

**SMN** - *Survival Motor Neuron*

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**ssDNA** - DNA de cadeia simples, do inglês *single-stranded DNA*

**ssRNA** - RNA de cadeia simples, do inglês *single-stranded RNA*

**TALENs** - Nucleases Efetoras Semelhantes a Ativadores da Transcrição, do inglês *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

**tracrRNA** - trans-ativador CRISPR RNA

**TTF1** - *Thyroid Transcription Factor-1*

**VEGF** - Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

**ZFNs** - Nucleases dedos de zinco, do inglês *Zinc Finger Nucleases*



# 1. Introdução

Em 2022, a população mundial atingiu 8 mil milhões de pessoas. Segundo as últimas projeções das Nações Unidas, estima-se que na década de 2080 se atinja um pico de cerca de 10,4 mil milhões de pessoas e que este número se mantenha até ao ano 2100. (1) Este aumento da população refletir-se-á, conseqüentemente, numa maior incidência de anomalias congénitas, nomeadamente em países subdesenvolvidos, onde o acesso ao diagnóstico pré-natal, bem como a possíveis intervenções na gravidez é limitado. Para além disto, o aumento da migração a que se tem assistido também irá propiciar para um aumento de doenças genéticas em países desenvolvidos. (2,3)

Segundo a World Health Organization (WHO), estima-se que todos os anos a nível mundial, morram 240.000 recém-nascidos devido a malformações congénitas, nos primeiros 28 dias após o nascimento. Adicionalmente, cerca de 170.000 mortes ocorrem em crianças entre 1 mês e 5 anos de idade. Estas constituem um grave problema de saúde pública, uma vez que se traduzem numa causa importante de aborto, morte prematura ou incapacidade ao longo da vida e podem resultar de fatores genéticos, ambientais, socioeconómicos e demográficos, sendo que a maioria apresenta uma etiologia idiopática. (4,5)

Os avanços que têm ocorrido nas áreas da Biologia Molecular e Medicina Materno-Fetal têm permitido uma melhor caracterização e identificação de condições genéticas, bem como a sua deteção e diagnóstico pré-natal. Por conseguinte, o facto de ser possível diagnosticar uma doença antes do nascimento, remete para o potencial de uma possível intervenção antes do nascimento e do início dos sintomas. (6)

Muitas vezes, perante um diagnóstico pré-natal de uma condição genética grave, são apresentadas aos pais as opções de continuação da gravidez, com posterior tratamento pós-natal, se tal existir, ou interrupção da mesma. Contudo, estas opções acarretam uma grande carga emocional e financeira para as famílias, sendo que muitas vezes os tratamentos disponíveis são limitados e passam pelo alívio sintomático da patologia, o que se traduz numa baixa qualidade de vida para o doente. Assim, surge uma necessidade de desenvolver terapêuticas que permitam o tratamento destas condições genéticas graves antes do nascimento. (7)

Apesar de a cirurgia fetal e o transplante de células estaminais *in utero* serem terapêuticas utilizadas há algum tempo no tratamento de condições congênitas, estas encontram-se limitadas a um subconjunto de patologias, defeitos congênitos estruturais e distúrbios hematológicos congênitos, respetivamente. Em oposição, surge a terapia génica no período pré-natal como uma estratégia terapêutica racional e promissora no tratamento de doenças monogénicas, permitindo a correção do fenótipo de uma ampla gama de distúrbios genéticos *in utero*. (6,8) Esta pode envolver a entrega de material genético ao feto ou à mãe, neste último caso denomina-se de terapia génica materna, utilizada de forma a tratar uma determinada condição que afete o feto *in utero*. No entanto, a presente dissertação irá incidir mais na terapia génica administrada ao feto. (9)

Embora os ensaios de terapia génica no período pós-natal sejam encorajadores, tendo já sido aprovados alguns medicamentos à base desta terapia, estes apresentam algumas limitações, nomeadamente uma barreira imunológica e o tratamento da patologia, muitas vezes, após a irreversibilidade dos danos causados por esta. Pelo contrário, ao ser realizada uma terapia génica antes do nascimento, há o potencial de aproveitar as propriedades inerentes ao desenvolvimento normal do feto, de forma a aumentar a eficácia da mesma, das quais: o seu pequeno tamanho, imaturidade imunológica e tolerância a novos antigénios, acessibilidade e natureza proliferativa de células estaminais ou progenitoras de múltiplos órgãos, facilidade em transpor a barreira hematoencefálica imatura e ainda o potencial para tratar a doença antes do nascimento e do início dos sintomas. (10,11) Assim, doenças que se desenvolvam *in utero* e resultem em morbidade e/ou mortalidade durante a gestação ou após o nascimento e para as quais não existam tratamentos pós-natais eficazes, beneficiariam desta terapêutica. Algumas das doenças candidatas ao tratamento com esta terapia seriam a atrofia muscular espinal, doenças lisossomais de sobrecarga, hemofilia, as hemoglobinopatias, doenças pulmonares monogénicas, entre outras. (7,10)

Contudo, até ao presente momento ainda não foram realizados ensaios clínicos de terapia génica em fetos humanos, uma vez que antes de uma possível passagem para a prática clínica será necessário estabelecer a sua segurança e eficácia em modelos animais. O que se torna particularmente importante neste tipo de abordagem, visto que engloba dois doentes, o feto e a progenitora. Para além disto, o risco de possíveis efeitos fora do alvo ou transmissão da linha germinativa, necessitam de ser avaliados. (10)

## 2. História da Terapia Génica e da Terapia Génica Pré-natal

Desde a descoberta de que se podia transferir novo material genético para células humanas e, deste modo, induzir a expressão de genes e proteínas, inúmeros investigadores trabalharam ao longo dos anos para alcançar este objetivo. Ainda a sequência do genoma humano não tinha sido determinada e já se especulava sobre a terapia génica e suas possíveis aplicações. Contudo, a taxa de progresso desta terapêutica tem variado nas últimas décadas, entre períodos de entusiasmo e períodos de reserva. (12,13)

O conceito de terapia génica terá surgido durante os anos 60 e início dos anos 70, como resultado dos inúmeros avanços no conhecimento de biologia celular e genética molecular, bem como do desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante (rDNA). (14,15) Em 1972, Theodore Friedmann e Richard Roblin publicaram um artigo na revista *Science*, onde propunham a terapia génica como estratégia terapêutica no tratamento de doenças genéticas hereditárias, através da utilização de DNA exógeno saudável. Neste artigo, os autores também propuseram critérios ético-científicos, com o objetivo de evitar uma aplicação clínica prematura em humanos. (16)

Em 1990, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro ensaio clínico de terapia génica em humanos. Duas crianças com 4 e 9 anos de idade, que apresentavam imunodeficiência combinada grave por deficiência de adenosina desaminase (ADA-SCID, do inglês *Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency*), foram tratadas com linfócitos T modificados *ex vivo* com recurso a um vetor retroviral, que continha a cópia funcional do gene responsável pela síntese da enzima adenosina desaminase (ADA). Após 2 anos de tratamento, verificou-se que a expressão do gene nas células T persistia, contudo, um dos doentes exibiu uma resposta temporária, enquanto o segundo exibiu uma resposta menor. Apesar disto, este ensaio veio demonstrar o potencial desta terapêutica no tratamento da ADA-SCID e, possivelmente, de outras patologias, bem como fornecer orientação para estudos posteriores. (17,18)

Contudo, dois ensaios com resultados infelizes, levaram a uma interrupção no desenvolvimento de novos ensaios de terapia génica. O primeiro caso, ocorreu em 1999, quando Jesse Gelsinger de 18 anos, com uma deficiência parcial de ornitina transcarbamilase (OTC, do inglês *Ornithine Transcarbamylase*), enzima pertencente ao ciclo da ureia, participou num ensaio clínico de terapia génica que envolvia a utilização de um vetor de adenovírus que continha o gene OTC. Quatro dias depois da

administração da terapêutica, Jesse acabou por morrer por falência de múltiplos órgãos, devido a toxicidade associada ao vetor. Um outro caso, foi relativo ao desenvolvimento de leucemia em crianças com Imunodeficiência Combinada Severa ligada ao X (SCID-X1, do inglês *X-linked severe combined immunodeficiency*), após terapia génica *ex vivo* mediada por um vetor retroviral. Este efeito adverso inesperado resultou de uma integração do vetor na proximidade do promotor do proto-oncogene LIM only-2 (LMO2), levando à sua transcrição e, conseqüente, expressão aumentada. (19,20) De modo a evitar que tais acontecimentos se repetissem no futuro, ocorreu uma crescente pesquisa na procura de vetores mais seguros e eficazes. (12)

O primeiro produto de terapia génica, Gendicine, com indicação para o carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço (HNSCC, do inglês *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) foi aprovado em 2003, pela *China Food and Drug Administration* (CFDA). (21) Em 2005, a CFDA aprovou outra terapêutica com base em terapia génica, Oncorine, indicado para o carcinoma nasofaríngeo. (22) Quase uma década depois, em 2012, a Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) recomendou um produto de terapia génica para aprovação na União Europeia, pela primeira vez. Glybera trata-se de um vetor adenoassociado (AAV) concebido para expressar a lipoproteína lípase no tecido muscular, indicado no tratamento da deficiência lipoproteína lípase. (17)

Desde então e, nos últimos anos, vários produtos de terapia génica têm sido aprovados na Europa e Estados Unidos da América, ao demonstrarem um claro benefício clínico, nomeadamente em doenças para as quais a medicina convencional não oferece uma cura. Tem-se assistido a um recrutamento predominante de doentes mais jovens, em ensaios clínicos para doenças monogénicas, o que se deve possivelmente à questão de já terem ocorrido alterações patológicas irreversíveis em indivíduos mais velhos ou por a doença ser fatal numa fase precoce da vida. Deste modo, o conceito de terapia génica no período pré-natal revela-se como uma extensão a este princípio, ou seja, a intenção de tratar as doenças antes do aparecimento de danos irreversíveis no organismo. Na realidade, esta ideia de administrar um produto de terapia génica no período pré-natal surgiu há tanto tempo quanto os cientistas têm trabalhado na terapia génica no período pós-natal, como uma forma de ultrapassar as dificuldades até então sentidas, como por exemplo, deficiente distribuição de vetores, ineficácia e transitoriedade da terapêutica, bem como reações imunes ao vetor e à proteína terapêutica. (23-25)

Esta ideia do “feto como o doente” não era nova, na verdade o primeiro relato de intervenção terapêutica no período pré-natal, surgiu em 1963 com a realização de uma transfusão sanguínea intraperitoneal para a doença hemolítica por isoimunização Rhesus, publicada por Sir Albert William Liley. Este procedimento veio revolucionar a medicina fetal, numa altura em que a doença hemolítica no feto era bastante comum e ainda não havia ultrassonografia. (26,27) Com a introdução da ultrassonografia, no final dos anos 70, este procedimento tornou-se mais seguro. (28) Anos mais tarde, em 1981, Michael Harrison realizou a primeira cirurgia fetal aberta num feto humano com obstrução do trato urinário. Este marco veio possibilitar o desenvolvimento de vários procedimentos para uma panóplia de malformações estruturais no feto. (29,30). Ainda nos anos 80, realizou-se o primeiro transplante bem-sucedido de células estaminais *in utero* num feto humano. (31) Embora as intervenções terapêuticas anteriormente mencionadas, cirurgia fetal e o transplante de células estaminais *in utero*, tenham demonstrado o seu sucesso no tratamento de certos distúrbios congénitos, as suas aplicações na terapêutica encontram-se muitas vezes limitadas a um conjunto de doenças. (32)

Em 1995, apenas alguns anos após o primeiro ensaio clínico de terapia génica em humanos, realizaram-se as primeiras tentativas de terapia génica pré-natal *in vivo*, em modelos animais. (33) Em 1998, o Gene Therapy Advisory Committee (GTAC) apresentou um relatório sobre o potencial uso da terapia génica *in utero*. (34) Um ano mais tarde, em 1999, o US National Institute for Health Recombinant DNA Advisory Committee (NIH RAC), publicou um relatório relativo às questões científicas, médicas e éticas relacionadas com esta terapia, após os Drs. W. French Anderson e Esmail Zanjani submeterem dois protocolos de testes preliminares de terapia génica pré-natal. (35) Ambos os relatórios reconheceram o potencial desta terapêutica na prevenção ou tratamento de doenças genéticas graves, contudo, concluíram que os dados disponíveis na altura eram insuficientes para se prosseguir com ensaios clínicos, havendo a necessidade adicional de desenvolvimento tecnológico e científico prévio. Alertaram, também, para o facto desta terapia apenas se destinar a células somáticas e, a reserva sentida em relação a uma possível integração por parte do vetor viral na linha germinativa. Quanto a questões éticas, recomendaram a necessidade de um consentimento informado para qualquer intervenção no futuro, bem como uma análise prévia dos riscos relativamente aos benefícios, quer para o feto, como também para a progenitora.

Desde então, vários estudos utilizando modelos animais, como murganhos, ovelhas e primatas demonstraram a segurança e a eficácia desta terapêutica. (36). Num estudo realizado recentemente, foi descrita a primeira aplicação bem-sucedida da terapia génica pré-natal num modelo de murganho com doença de Gaucher neuropática aguda (nGD, do inglês *acute neuronopathic Gaucher disease*). Esta é uma doença autossómica recessiva causada por mutações no gene que codifica a glucocerebrosidase. Em crianças, esta é fatal e não tratável, uma vez que as enzimas não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica. Neste estudo, observou-se que o vetor viral AAV contendo o gene GBA reconstituía a expressão neuronal da enzima, melhorando a inflamação neuronal, bem como a sobrevivência dos murganhos, até pelo menos 18 semanas. Neste estudo, também se administrou uma injeção intracraniana a outro grupo de murganhos no período neonatal, verificando-se também uma melhoria na sobrevida, mas em menor grau, destacando, assim, o benefício da terapia pré-natal. (37)

Em 2018, a Sociedade Internacional de Transplante Fetal e Imunologia (IFeTIS, do inglês *International Fetal Transplantation and Immunology Society*) organizou um painel de especialistas, na sua reunião anual, de modo a discutir questões científicas, clínicas e éticas, bem como atualizar as recomendações para o desenvolvimento e implementação da terapia génica *in utero*. Concluíram, então, o facto de esta ser uma terapêutica promissora no tratamento e/ou cura de muitas doenças genéticas hereditárias, podendo, deste modo, alterar drasticamente a maneira como percebemos e tratamos muitas doenças genéticas. (38)

Embora o desenvolvimento desta terapêutica ainda se encontre em fase pré-clínica, não existindo ainda ensaios clínicos a decorrer, espera-se que esta consiga num futuro próximo, ser utilizada na prática clínica de certas doenças específicas. (3)

### 3. O conceito de Terapia Génica

Segundo a EMA, um medicamento de terapia génica pode ser definido como um medicamento biológico que “contém uma substância ativa que inclui ou consiste num ácido nucleico recombinante usado ou administrado no ser humano tendo em vista a regulação, a reparação, a substituição, a adição ou a supressão de uma sequência genética”; sendo que “os seus efeitos terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico estão diretamente relacionados com a sequência do ácido nucleico recombinante que contém, ou com o produto da expressão genética desta sequência”. É importante referir que nestes não se encontram incluídas as vacinas contra doenças infecciosas. (39)

Ou seja, a terapia génica é uma estratégia terapêutica que possibilita a entrega de material genético terapêutico às células, de modo a corrigir uma anomalia existente ou fornecendo a estas uma nova função. O material genético é transportado para dentro da célula, com recurso a vetores, podendo estes ser virais ou não virais. (9)

Com base no tipo de células ou tecidos que vão sofrer modificação genética, a terapia génica pode ser dividida da seguinte forma: em terapia génica germinativa e em terapia génica somática. A primeira, teria como alvo as células da linha germinativa. Consequentemente, as alterações iriam ser transmitidas às gerações futuras, permitindo assim erradicar a doença. Contudo, desde o início, que esta forma de terapia génica é controversa e eticamente inaceitável, uma vez que não é considerada cientificamente justificável, sendo imprevisível no seu resultado, podendo até provocar danos na saúde do indivíduo. (9,40-42) Relativamente à anterior, a terapia génica em células somáticas é considerada segura, uma vez que as modificações genéticas não vão ser transmitidas à descendência, exercendo efeito apenas no indivíduo. (40). Esta envolve a inserção de genes em células não germinativas, podendo visar diretamente o indivíduo, ou pode ser realizada *ex vivo*, onde células colhidas do doente são, posteriormente, reintroduzidas no organismo, após modificação e expansão *ex vivo*. A seleção do procedimento irá depender do tecido afetado ou do tipo de célula que requer a correção. (43)

### 3.1. Terapia Génica Pré-natal

#### 3.1.1. O Fundamento

Apesar de os ensaios de terapia génica pós-natal serem encorajadores, existem limitações que impedem que se atinja o potencial terapêutico desejado, entre as quais uma barreira imunológica e o tempo entre o início da doença e o início do tratamento. Muitas das patologias candidatas à terapia génica nas crianças ou adultos podem ser diagnosticadas numa fase precoce da vida. Para além disto, algumas doenças genéticas que se desenvolvem durante a gestação apresentam mortalidade elevada no período pré-natal ou após o nascimento. Assim, a terapia génica no período pré-natal apresenta-se como uma estratégia racional no tratamento destas doenças genéticas, não havendo necessidade de esperar até depois do nascimento, período no qual já possam estar instalados danos irreversíveis derivados da patologia em questão. Contudo, mesmo em doentes onde a patologia possa ser tratada no período pós-natal, existem benefícios económicos, assim como psicológicos, uma vez que permitiria o nascimento de um bebé saudável, que, idealmente, não necessitaria de tratamentos adicionais. (10,27)

Os avanços que têm ocorrido no diagnóstico pré-natal, nomeadamente a sequenciação de nova geração, assim como a realização de testes não invasivos, possibilitam que muitas anomalias congénitas sejam diagnosticadas antes do nascimento e, cada vez mais cedo na gestação. (10, 44) O diagnóstico da maioria destas condições pode ser feito com recurso a ultrassonografia de alta resolução e a técnicas moleculares utilizando células fetais ou DNA fetal livre no sangue materno, com pouco risco para a progenitora ou feto. (36,45) As técnicas invasivas incluem a amniocentese, que pode ser feita entre as 15 e as 16 semanas de gestação, ou a biópsia de vilosidades coriónicas, que pode ser realizada entre as 11 e as 14 semanas de gestação. (46) Também existe a possibilidade de realizar o teste não invasivo pré-natal (NIPT, do inglês *Non Invasive Prenatal Test*), que permite fazer o rastreio de determinadas doenças através da análise de DNA fetal de células livres no sangue materno, uma vez que durante a gravidez, até 10% do DNA circulante no sangue materno tem origem na placenta. Este pode ser realizado à décima semana de gestação, no entanto, não substitui os testes de diagnóstico padrão, isto é, a amniocentese e biópsia de vilosidades coriónicas. (47-49) Os testes genéticos permitem muitas vezes identificar condições genéticas, após manifestações na ultrassonografia, como por exemplo, a hidrósia fetal não imune, caracterizada por uma

acumulação patológica de líquido extracelular nos tecidos moles e cavidades serosas do feto. Esta constitui uma anomalia fetal, muitas vezes letal e, que apresenta inúmeras causas genéticas. (7,50,51)

Aquando da identificação de um diagnóstico pré-natal de doença genética, são apresentadas muitas vezes aos progenitores duas escolhas: interrupção da gravidez ou uma abordagem de “esperar para ver”, isto é, manter a gravidez e, posteriormente ao nascimento são realizados, se tal existirem, tratamentos de modo a aliviar manifestações associadas. No caso de gestações posteriores, as opções permanecem limitadas à fertilização *in vitro* com diagnóstico genético pré-implantação, de modo a evitar uma gravidez afetada pela doença. Contudo, estas opções acarretam uma grande carga emocional e financeira para as famílias. A terapia génica pré-natal vem surgir, deste modo, como uma terceira opção de escolha, que permite corrigir ou melhorar a doença *in utero* antes da irreversibilidade da mesma. (7)

A terapia génica pré-natal ideal seria aquela que através de uma única administração, fosse capaz de tratar ou curar uma determinada doença congénita grave, ao fornecer uma expressão terapêutica sustentada de um transgene, que se mantivesse ao longo da vida do indivíduo. (Figura 3.1.) (9)



Figura 3.1. Representação esquemática da terapia génica pré-natal ideal. Adaptado de (52)

A realização da terapêutica antes do nascimento e da irreversibilidade da patologia acaba por ser um dos fortes argumentos aliados a esta terapêutica, no entanto o feto apresenta inúmeras propriedades inatas aquando do seu desenvolvimento, que se encontram enumeradas no ponto 3.1.3., e que tornam este um recipiente ideal para receber a terapia génica e/ou edição génica. Estas propriedades vão permitir aumentar a eficácia desta terapêutica e ultrapassar algumas das limitações sentidas aquando da realização da mesma no período pós-natal. (10) Com isto, ao longo destas últimas décadas, vários estudos pré-clínicos em modelos animais foram realizados, de forma a demonstrarem o potencial desta terapia no tratamento e cura de doenças genéticas graves. (9)

### 3.1.2. Os Tipos de Terapia Génica Pré-natal

Os procedimentos relativos à terapia génica no período pré-natal podem ser classificados da seguinte forma: em transplante *in utero* de células estaminais fetais corrigidas por genes (*ex vivo*), em terapia génica pré-natal somática direta (*in vivo*) ou ainda em terapia génica materna. (9)

#### a) Terapia Génica Pré-natal *Ex Vivo*

Relativamente à transferência de genes *ex vivo* (Figura 3.2.), este procedimento envolve a colheita de células alvo do doente e, posterior transdução ou transfecção *in vitro* com recurso a vetor contendo o gene pretendido ou ainda por edição genética. Estas células são, posteriormente, reintroduzidas no indivíduo, com o fim de restaurar o fenótipo saudável. (53) As células “corrigidas” devem estar presentes no organismo em quantidade suficiente e serem capazes de escapar do reconhecimento por parte do sistema imunológico, persistindo, assim, por um longo período de tempo, com o propósito de reverter a condição que se pretende tratar. Estas devem ter também a capacidade de transmitir a “correção” à descendência. (54) Esta abordagem, tem sido aplicada com sucesso no período pós-natal, como por exemplo, no tratamento de ADA-SCID (*Strimvelis*),  $\beta$ -talassemia (*Zynteglo*) e linfoma difuso de grandes células B (*Yescarta* e *Kymriah*). (55,56) As células alvo mais comumente utilizadas são células estaminais

hematopoiéticas (HSC, do inglês *Hemopoietic Stem Cell*) e linfócitos T. (43,54) As HSC são células com grande capacidade de diferenciação, bem como de auto-renovação e regeneração. São relativamente fáceis de identificar e isolar. Por conseguinte, ao introduzir estas células “corrigidas” no doente garantir-se-ia a transmissão das modificações genéticas às células descendentes. Deste modo, a terapia génica tendo por base células estaminais tornou-se num grande interesse para muitos investigadores nesta área. (54,57)

Comparativamente ao alotransplante de HSC, a presente abordagem, o transplante de HSC autólogas modificadas apresenta diversas vantagens, nomeadamente, o facto de o organismo oferecer pouca ou nenhuma resistência ao enxerto, assim como não haver o risco de ocorrer a doença do enxerto contra o hospedeiro. Outra vantagem importante é o facto de não se estar dependente da disponibilidade de doadores. (58)

No feto, estas células, HSC, poderiam ser isoladas a partir do fígado, do sangue, placenta ou do líquido amniótico. (59) Este procedimento torna possível a correção das células alvo, evitando a exposição das células não-alvo ao vetor viral, sendo que no caso da terapia génica *in utero*, possibilita a não exposição da mãe à terapêutica. Contudo, destaca-se a dificuldade no processo de recolha de células, assim como o risco acrescido para o feto, pois este é um procedimento minimamente invasivo, não sendo possível a colheita, em segurança, de um número adequado de células para posterior modificação e expansão *ex vivo*, comprometendo, deste modo, a eficácia da terapêutica. (10,60)

#### b) Terapia Génica Pré-natal Somática Direta

Neste caso, a terapia génica é entregue diretamente ao doente (Figura 3.2.), podendo recorrer ao uso de vetores virais ou não virais. (10) No contexto atual e, comparativamente à transferência de genes *ex vivo*, a presente abordagem seria mais relevante no caso da terapia génica no período pré-natal, uma vez que se diminuem os procedimentos invasivos, bem como a sentida dificuldade na recolha de células estaminais, reduzindo, deste modo, o risco de aborto. Adicionalmente, ocorre entrega direta dos vetores ao órgão-alvo e o custo associado a este procedimento é menor. Contudo, desvantagens podem incluir a biodistribuição generalizada para órgãos não-alvo, quer no feto como na mãe, devido à transferência transplacentária. Este método tem sido eficazmente utilizado em vários modelos animais experimentais de terapia génica *in*

*utero*. (3,52) Neste período, a terapia poderá ser administrada sistêmica ou localmente, por via intravenosa, intracraniana, intramuscular, intraperitoneal, intraventricular, intratraqueal ou na cavidade amniótica. (8)

Até ao presente momento, ainda não houve ensaios clínicos de terapia gênica *in utero*, sendo que a maioria dos estudos em modelos animais se concentram na terapia gênica *in vivo* mediada por vetor viral. (10)

### c) Terapia Gênica Materna

Atualmente, mais mulheres com distúrbios metabólicos ou outras doenças genéticas atingem a idade fértil e engravidam, graças à melhoria no diagnóstico precoce e, posterior tratamento destas condições. Algumas destas condições, incluem a deficiência em fenilalanina hidroxilase, fibrose cística, síndrome de Turner, anemia falciforme, distúrbios do tecido conjuntivo, entre outros. Para além destas apresentarem um impacto significativo na saúde da mulher, aquando da gravidez podem também afetar negativamente o desenvolvimento do feto, causando, por exemplo, embriopatias, restrição do crescimento fetal ou lesão cerebral, podendo mesmo resultar em aborto. (61)

Deste modo, a terapia poderá ser administrada à progenitora quando a patologia da mesma afeta o feto, o que acontece, por exemplo, na insuficiência placentária. (9, 62) Neste período existe uma interdependência entre a mãe e o feto, logo a expressão de proteínas na mãe vai trazer benefícios translacionais para o feto. Ao contrário do que acontece no resto das terapias gênicas, onde se pretende um efeito de longo prazo, na terapia gênica direcionada à mãe, apenas seria necessária uma expressão gênica de curto prazo, de modo a controlar a patologia materna. (63) Neste seguimento e, apesar de ainda não ser iminente a realização de um ensaio clínico de terapia gênica fetal *in vivo*, está a ser desenvolvido um ensaio clínico com base em terapia gênica materna, em que a doença alvo afeta o feto.

Trata-se do estudo EVERREST (NCT02097667), um estudo coorte prospetivo multicêntrico europeu, que apresenta como fim o tratamento da restrição de crescimento fetal (FGR, do inglês *Fetal growth restriction*) devido à insuficiência placentária, uma condição obstétrica para a qual ainda não existe um tratamento disponível. Numa primeira fase, pretende-se criar um banco de dados relativo às gestações afetadas por FGR grave

de início precoce. Os dados recolhidos irão fornecer as informações necessárias para o desenvolvimento desta nova terapia, bem como para a condução do ensaio clínico EVERREST, onde será administrada, através das artérias uterinas, uma terapia génica adenoviral, sendo fornecido o transgene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) com o propósito de aumentar o fluxo sanguíneo uterino. (64) Este fator é secretado pela placenta e, vai induzir a vasodilatação, bem como mediar a vasculogénese e a angiogénese. (65,66) Contudo, comparativamente com a gravidez normal, na FGR os níveis séricos maternos de VEGF são significativamente mais baixos. (67,68) A eficácia desta terapêutica já foi demonstrada em estudos pré-clínicos realizados em modelos animais, ovinos, onde se verificou um aumento do crescimento fetal com a administração desta terapia, fornecendo assim a base para o estudo atual. Apesar desta não visar especificamente o feto, pode fornecer uma ligação entre os ensaios clínicos de terapia génica em adultos e em fetos. (52,69)

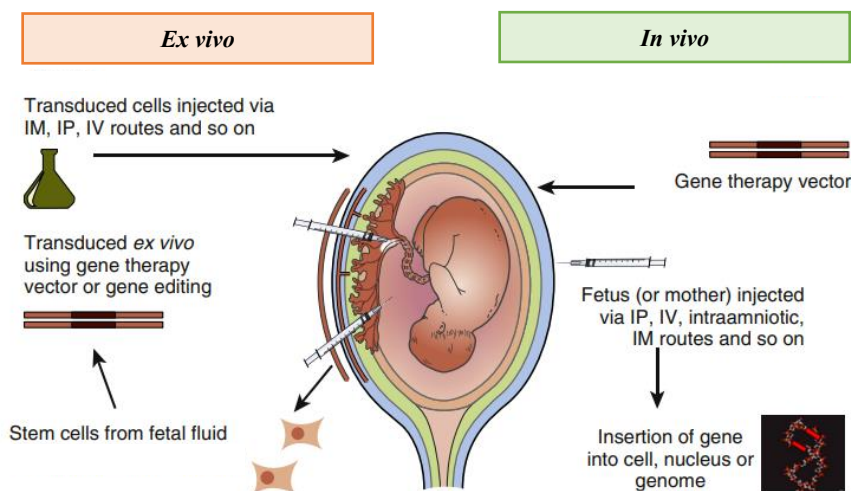


Figura 3.2 – Representação dos diferentes tipos de terapia génica pré-natal. No caso da terapia génica pré-natal de células estaminais, estas podem ser colhidas do fluido amniótico ou sangue, com posterior transdução *ex vivo*, e reintrodução das mesmas, já corrigidas, no feto. A terapia génica pré-natal também pode ser diretamente administrada ao feto ou à progenitora, por diferentes vias como intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), intravascular (IV), entre outras. Adaptado de (9)

### 3.1.3. Vantagens da Terapia Genética pré-natal

#### a) O tamanho do feto

O seu pequeno tamanho e peso permite maximizar a dose, ou seja, o número de partículas de vetor viral necessárias para fornecer o gene terapêutico ou a tecnologia de edição génica, por peso do recipiente. Entre as 14 e 16 semanas de gestação, o feto pesa cerca de 100 mg, em contraste com um recém-nascido de 4 kg ou um adulto de 60kg (proporção de peso 1:40:600), o que se vai traduzir numa vantagem, uma vez que para atingir o mesmo efeito, a dose necessária é menor, tornando o processo de produção também mais económico. (10,11)

#### b) A imaturidade imunológica do feto

Uma das limitações que afeta a eficiência da terapia génica pós-natal é o desenvolvimento de uma resposta imune às proteínas da cápside viral, às proteínas transgénicas ou mesmo aquando da edição génica, à proteína Cas9. Especificamente, um estudo demonstrou a presença de anticorpos anti-AAV em neonatos, crianças e adolescentes, consequência de uma infeção natural no início da vida. Estes níveis de anticorpos circulantes tendem a aumentar progressivamente ao longo da vida. Deste modo, a deteção da imunidade preexistente ao vetor viral, antes da realização da terapia génica, torna-se indispensável de forma a evitar respostas imunes potencialmente fatais. (7,70,71)

Pelo contrário, o facto de o sistema imunológico do feto ser imaturo, permite a tolerância de novos antígenos, que estes sejam reconhecidos como “self”, resultando numa reduzida resposta imunológica e, possibilitando a readministração da terapia após o nascimento, se tal for necessária. Esta tolerância imunológica está associada ao facto das células T fetais *naïve* apresentarem maior probabilidade de se tornarem células T reguladoras após exposição a um novo antígeno, suprimindo a resposta imune fetal, em vez de se tornarem células T efectoras. (7,72,73) O facto de os fetos nunca terem sido expostos aos vetores virais utilizados na terapia génica, a menos que ocorra uma infeção viral, torna improvável que uma resposta de memória resulte de uma primeira exposição à terapia. Contudo, pode ser possível a passagem transplacentária de anticorpos maternos

pré-existentes contra a proteína da cápside viral de determinado vetor, por exemplo, o que ia limitar a eficácia da terapia *in utero*. Logo, neste caso, seria necessário testar se o vetor proposto para terapia fetal era suscetível a resposta imune por parte da progenitora ou realizar a terapia antes do transporte de imunoglobulina G materna para o sangue fetal, que tem início no segundo trimestre, adquirindo-se a maioria dos anticorpos durante o terceiro trimestre. É importante salientar que, como observado em alguns estudos pré-clínicos, a administração pré-natal da terapia gênica induziu tolerância ao transgene, no entanto não resultou em tolerância à proteína da cápside viral, uma vez que a exposição é transitória. (7,74)

c) Acessibilidade e natureza proliferativa de células estaminais ou progenitoras de múltiplos órgãos

A entrega do gene terapêutico a uma determinada população de células alvo de forma eficiente é fundamental para o sucesso terapêutico. As células estaminais ou progenitoras encontram-se acessíveis no feto e em proliferação de modo a suportar a expansão contínua que ocorre durante a gestação. Estas características possibilitam a propagação da correção genética, migração e distribuição em ambiente fetal. Ou seja, mesmo que a população alvo celular seja constituída por um pequeno número de células, a sua transdução pode resultar em níveis significativos da correção genética ao nascimento. Deste modo, tornam-se células alvo ideais na terapia gênica, especialmente quando são utilizados vetores virais integrativos ou na edição gênica, uma vez que permite a transmissão do gene terapêutico ou da correção do genoma às células descendentes, com a esperança que a modificação genética permaneça ao longo da vida do indivíduo. Pelo contrário, a maioria das populações de células estaminais ou progenitoras no adulto encontram-se num estado quiescente sob homeostasia, podendo ser de difícil acesso tendo em conta a distribuição dos tecidos e barreiras anatómicas, o que se poderá traduzir assim, num reduzido grau de expansão de células transduzidas, constituindo, deste modo, um fator limitante da eficácia da terapia gênica. Assim, vários estudos pré-natais em modelos animais foram desenvolvidos, como forma de demonstrar a capacidade de atingir estas células em múltiplos órgãos e daí resultar uma expressão gênica sustentada. A capacidade e eficiência de atingir diferentes órgãos encontra-se dependente das seguintes variáveis: do sistema de entrega, da via de administração da terapia e a idade gestacional aquando da sua realização. (10,11,36,75)

#### d) Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica

A permeabilidade da barreira hematoencefálica torna-se vantajosa, uma vez que permite entregar por administração sistémica a terapia génica ao nível do sistema nervoso central (SNC) e, deste modo proporcionar o tratamento de doenças associadas. Assim, evita-se a necessidade de injeções intratecais, que são realizadas no período pós-natal para aceder ao SNC. A entrega de genes neste órgão podia, então, possibilitar uma correção precoce o suficiente para prevenir alterações patológicas irreversíveis no cérebro. (7,8)

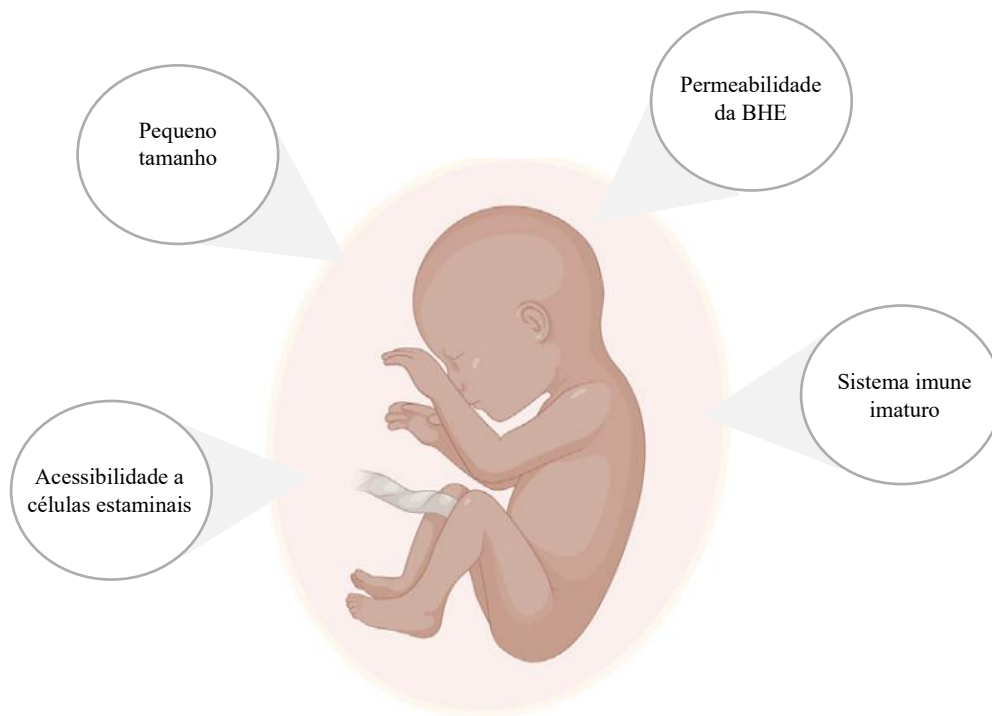


Figura 3.3. – *Representação das vantagens da terapia génica pré-natal.*  
Adaptado de (49)

## 4. Entrega da Terapia Génica ao Feto

Primeiramente, o vetor deverá entrar na circulação fetal. Dever-se-á garantir a segurança da progenitora aquando deste processo, assim como do feto, sendo importante maximizar a transferência da terapia para o mesmo e, por conseguinte, minimizar a mesma para a progenitora. Já em circulação, o vetor deverá atingir o alvo, devendo evitar-se que afete outros tecidos. (8) Contudo, este é um processo complexo e que necessita de ser altamente regulado uma vez que, vários estudos relataram uma distribuição generalizada da terapia, embora em níveis mais baixos, para outros tecidos que não o alvo. (76,77) Para além disso, podem-se suceder consequências, como por exemplo, modificação da linha germinativa ou carcinogénese se, em ambiente fetal, a expressão do transgene ocorrer em local ou tempo não apropriados. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de sistemas de entrega que apresentem especificidade para as células ou tecidos alvo.

Outro fator importante a considerar é o efeito da exposição fetal nos vetores, uma vez que a entrega da terapia é feita em muitos compartimentos fluidos, como soro, vias aéreas ou líquido amniótico. O soro humano pode inativar retrovírus e o líquido amniótico inibe a infeção pelos mesmos. Assim pode ser necessária uma alteração na construção do vetor retroviral, de modo a torná-lo mais resistente à inativação. O mesmo não acontece com outros vetores, como por exemplo, os vetores lentivirais, adenovirais ou adeno-associados. (9,78)

Já a nível intracelular, o facto de o vetor de entrega poder ser sensível ao pH fetal ou a variação de temperatura pode constituir uma barreira à transferência do material genético até ao núcleo. (8)

Para que a terapia atinja a sua eficácia terapêutica, o genoma do vetor deverá persistir dentro da célula. O gene terapêutico pode permanecer no núcleo sob a forma episomal ou pode integrar o genoma do hospedeiro, persistindo, deste modo, nas células-filhas. Os vetores episomais, como por exemplo, os vetores adenovirais e adeno-associados, conseguem persistir durante um longo período quando entregues a tecidos quiescentes. Porém, as células fetais possuem uma natureza altamente proliferativa, podendo prejudicar a eficiência destes vetores. Já os vetores capazes de se integrarem no genoma do hospedeiro, como o caso dos vetores retrovirais, podem persistir durante um período maior nas células, no entanto há um maior risco de mutagénese por inserção e

desenvolvimento posterior de tumores aquando da sua utilização. Torna-se assim importante a otimização dos sistemas de entrega, com o intuito de maximizar a persistência do gene terapêutico e minimizar possíveis riscos. Outro fator que deve ser tido em conta, é o potencial silenciamento epigenético do transgene, durante a reprogramação epigenética fetal. (8,36,40)

Por último, deve-se considerar a eliminação dos vetores de entrega em ambiente fetal. Um estudo, realizado no final da gestação, demonstrou uma clearance elevada por parte do feto para a morfina. Se o mesmo acontecer com os sistemas de entrega, a eficácia da terapêutica pode ser afetada, podendo ser necessária uma maior dose terapêutica. (8,79)

#### **4.1. Sistemas de Entrega**

Um desafio a ter em conta na terapia génica é o facto de os genes terapêuticos possuírem carga negativa e grandes dimensões, o que lhes impede de atravessar diretamente as membranas celulares. Para além disto, o DNA terapêutico precisa de escapar às endonucleases, assim como da clearance renal. Como tal, vão ser necessários veículos que façam chegar a terapia ao seu alvo. De um modo geral, os vetores de entrega podem ser classificados em vetores virais e vetores não virais, contudo, a maioria dos ensaios clínicos de terapia génica, cerca de 70%, recorrem a vetores virais, como por exemplo, retrovírus, lentivírus (Lv), adenovírus (Ad) e vírus adeno-associados. (40,80)

##### **4.1.1. Sistemas de Entrega Virais**

Um vírus é um parasita intracelular obrigatório, ou seja, depende da maquinaria da célula hospedeira para se replicar, podendo ser composto por um genoma de DNA ou RNA. Devido à capacidade que apresentam de infetar vários tipos de células, bem como de se replicarem dentro de um organismo, os vírus são utilizados na terapia génica como sistemas de entrega. (81)

Encontrar um vetor de entrega viral adequado para fornecer o gene terapêutico ao seu alvo, tornou-se um desafio na terapia génica, pois apesar de abundantes no meio

ambiente, os vírus apresentam diferenças na sua composição genética, apresentando diferentes vantagens e desvantagens. O facto de os vírus exibirem especificidade para diferentes tipos de células, permite que estes possam ser seleccionados com base no tipo de célula que necessita da terapêutica. (40)

Ao recorrer a estes vetores, aproveita-se a capacidade natural dos vírus de infetar células. Os vírus mais amplamente utilizados em ensaios clínicos são os adenovírus, lentivírus e vírus adeno-associados. Sendo que, os AAVs são maioritariamente escolhidos para aplicação *in vivo*, enquanto os vetores lentivirais são geralmente utilizados na terapia génica *ex vivo*. Os vírus com capacidade de integração no genoma do hospedeiro, como os retrovírus, permitem a expressão do transgene a longo prazo, mas apresentam um risco acrescido de mutagénese por inserção, especialmente se a integração for aleatória e não direccionada. Para além disto, apesar destes se tratarem de vetores virais “inativados”, não são completamente livres de riscos, podendo causar uma resposta imune nociva no hospedeiro. (52,82,83)

A escolha do vetor vai depender do tropismo tecidual, da capacidade de integração no genoma do hospedeiro, da sua imunogenicidade, bem como da capacidade de empacotamento e a facilidade de obtenção do vetor. (69) Resumindo, considera-se que o vetor de entrega ideal para a terapia génica pré-natal será aquele que produz uma expressão regulada e terapêutica do gene a longo prazo, através de uma entrega única e eficiente do gene. Este também deverá ser seguro para a mãe e feto. Em adição, o vetor deve ter espaço suficiente para incorporar quer o gene terapêutico, tal como os elementos reguladores, deve apresentar um tropismo específico para com o alvo, boa eficiência de transdução, uma baixa imunogenicidade, assim como reduzido potencial teratogénico e mutagénico. Nos estudos pré-clínicos de terapia génica fetal, foram mais frequentemente utilizados os adenovírus e AAV, bem como o lentivírus e o retrovírus. (9)

#### a) Retrovírus

Os retrovírus correspondem à Classe VI da Classificação de Vírus de Baltimore. Pertencem à família *Retroviridae* e são vírus envelopados, com cerca de 100 nm, que contêm duas cadeias de RNA envoltas por uma cápside. O seu genoma de RNA de cadeia simples (ssRNA) é retrotranscrito em DNA por meio da transcriptase reversa. O DNA sintetizado é, então, integrado no genoma da célula hospedeira, permitindo uma expressão

génica viral de longo prazo nas células infetadas e sua descendência. (41,84) Os retrovírus mais comuns são o gamma-retrovírus e o lentivírus, derivados, por exemplo, do vírus da leucemia murina (MLV, do inglês *murine leukemia virus*) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*), respetivamente. (Figura 4.1.) A principal diferença entre ambos, reside no facto do lentivírus conseguir infetar células pós-mitóticas, para além de células em divisão, enquanto o gamma-retrovírus apenas consegue infetar células em divisão. (40)

De uma forma geral, o genoma retroviral contém quatro tipos de genes: gene *gag* (codifica a poliproteína estrutural Gag necessária à montagem de partículas semelhantes a vírus), gene *pro* (codifica a protease viral, envolvida na maturação das partículas virais), gene *pol* (codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e Ribonuclease H) e o gene *env* (codifica as glicoproteínas de superfície viral e proteínas transmembranares, envolvidas na ligação ao recetor celular e, posterior fusão). Em cada extremidade deste genoma, encontram-se as longas sequências repetitivas (LTR, do inglês *long terminal repeat*). (Figura 4.1.) (41,85)

No desenvolvimento de vetores retrovirais, os genes virais são removidos e substituídos pelo gene terapêutico, tornando-os, deste modo, incapazes de se replicarem, e mantendo-se apenas, o sinal de *packaging*  $\Psi$  e as sequências LTRs, elementos estes necessários à introdução do genoma viral no DNA do hospedeiro. (41,84) Como vantagem, estes vetores virais possibilitam a inserção de um transgene com 9 a 12 kb, bem como uma expressão génica a longo prazo, no entanto, a falta de especificidade celular torna-se um problema. (86)

Ao longo do tempo, a utilização de vetores derivados do MLV tem vindo a diminuir e a ser substituída pelo uso de vetores lentivirais derivados do HIV-1 que, contrariamente aos anteriores, não requerem que a célula do hospedeiro se encontre em divisão celular. (84)

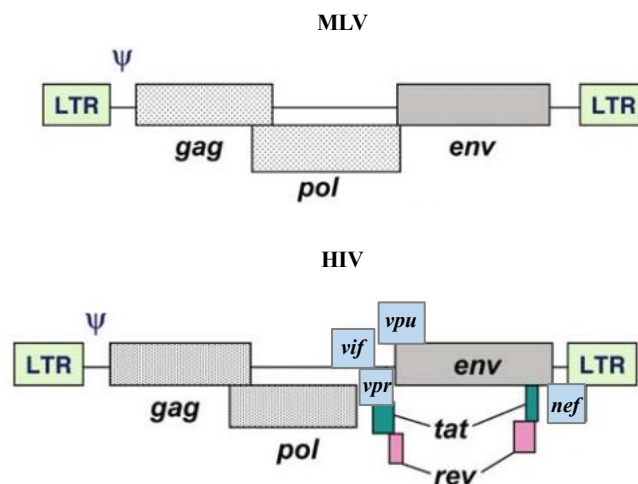


Figura 4.1. – Representação do genoma de um gamma-retrovírus e de um lentivírus. Adaptado de (87)

#### b) Lentivírus

Os lentivírus são uma subclasse de retrovírus, que demonstram interesse pela sua capacidade de infectar células em divisão, como também aquelas que não se encontram em divisão. Isto ocorre pois o complexo de pré-integração do vírus consegue atravessar a membrana nuclear da célula-alvo, ao contrário do gama-retrovírus, que só tem acesso ao cromossoma do hospedeiro quando a membrana nuclear se rompe durante a divisão celular. Um dos vírus mais estudados desta subclasse é o HIV-1. (41,88)

O seu genoma é similar ao dos retrovírus, contudo, os lentivírus são retrovírus complexos, requerendo de genes adicionais para a replicação viral. Ou seja, relativamente ao HIV, para além de conter no seu genoma genes *gag*, *pro*, *pol* e *env*, como também as sequências LTR, PBS (*primer binding site*) e o trato de polipurina (PPT), apresenta também dois genes reguladores adicionais (*tat* e *rev*) e ainda 4 genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), indispensáveis à replicação e patogenicidade *in vivo* do vírus. (84,88)

Os vetores LV derivados do vírus HIV-1 têm evoluído ao longo dos anos, com o objetivo de melhorar a segurança dos mesmos, como também a sua eficácia, sendo que para este efeito, ao longo das gerações foram-se omitindo cada vez mais genes virais. (89) De um modo geral, os vetores de primeira geração, consistiam em três plasmídeos, um

plasmídeo *packaging*, com todos os genes HIV reguladores e acessórios, excepto o gene *env*, que se encontrava noutra plasmídeo. O terceiro plasmídeo continha o gene terapêutico. Na segunda geração, manteve-se o sistema de três plasmídeos, tendo sido retirados apenas os genes acessórios, que promovem a proliferação e infecção viral, o que levou a uma maior segurança. (90-92) Os vetores Lv de terceira geração são os mais utilizados atualmente, sendo constituídos por quatro plasmídeos. O gene *tat* foi retirado do plasmídeo *packaging* e foram criados dois plasmídeos, um com os genes *gag* e *pol*, e outro com o gene *rev*. Os restantes plasmídeos mantiveram-se. (Figura 4.2.) (93,94) Atualmente, para além dos anteriores já existem os vetores de lentivírus de quarta geração. Devido à remoção do gene *tat*, nos vetores Lv de terceira e quarta gerações, o risco de reversão para vírus com competência de replicação *in vivo* é reduzido. (9)

Estes apresentam como vantagem uma expressão transgênica estável por integração no genoma do hospedeiro, baixa imunogenicidade, bem como um menor risco de genotoxicidade e mutagénese por inserção, em comparação com vetores retrovirais. Contudo, apresentam uma capacidade transgênica limitada. Vetores de terceira geração têm sido utilizados, maioritariamente, na terapia génica *ex vivo* de HSC para tratamento de hemoglobinopatias e imunodeficiências, tais como a anemia falciforme,  $\beta$ -talassémia e SCID. (52,95) Contudo, é improvável que o mesmo procedimento seja realizado no período pré-natal, devido à incapacidade de obter uma quantidade suficiente de células autólogas em segurança. (96)

Relativamente à aplicabilidade de vetores lentivirais na terapia génica *in utero*, num estudo pré-clínico foram realizadas injeções intra-hepáticas *in utero* de um vetor Lv que expressa a  $\beta$  globina, em fetos de murganhos com  $\beta$ -talassémia, sendo que se verificou uma normalização pós-natal dos níveis de hemoglobina no sangue. Os investigadores encontraram locais de integração não intencionais, integração no gene *Peg12*, que está associado à carcinogénese. Apesar disto, até às 32 semanas após o nascimento dos mesmos, não foi observado nenhum carcinoma hepatocelular nos modelos animais. (97)

De um modo geral, apesar destes vetores se mostrarem promissores para a terapia génica fetal, vai ser necessária uma pesquisa prévia à sua utilização em fetos humanos, relativamente à segurança e eficácia dos mesmos, bem como de promotores com especificidade tecidual. (93, 98)

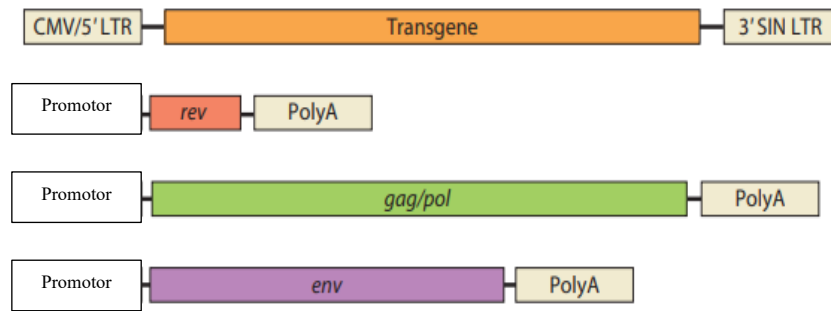


Figura 4.2. – Representação esquemática de um vetor baseado em lentivírus de terceira geração. Adaptado de (99)

### c) Adenovírus

Este vírus foi o primeiro vetor viral desenvolvido no âmbito da terapia gênica, tendo sido aprovado em 1990 para ensaios clínicos. Os adenovírus são vírus não envelopados que possuem um genoma de DNA de cadeia dupla (dsDNA) de, aproximadamente, 35 kb, encapsulado numa cápside icosaédrica com cerca de 70-100 nm. (14,40) Este vírus tem a capacidade de transduzir as células que se encontram em divisão, tal como as células quiescentes. São vírus não integrativos, ou seja, não integram o genoma do hospedeiro, minimizando, deste modo, o risco de mutagénese por inserção. Contudo, esta característica transpõe-se numa limitação da expressão do transgene a longo prazo. O seu uso na terapia gênica *in vivo* foi significativamente reduzido devido à sua elevada imunogenicidade, originando frequentemente respostas inflamatórias significativas, optando-se por outros vetores virais, tais como os AAVs e lentivírus. (52,83)

De uma forma geral, o genoma do adenovírus é organizado da seguinte forma: em genes *early* (E1, E2a, E2b, E3 e E4), genes *intermediate* (IX e IVA2) e genes *late* (L1, L2, L3, L4 e L5). O seu genoma contém também a sequência de *packaging*  $\psi$  e em cada extremidade, repetições terminais invertidas, ITRs (do inglês *inverted terminal repeats*). (100-102)

Ao longo dos anos foram surgindo, na terapia gênica, diferentes gerações de vetores adenovirais numa tentativa de desenvolver vetores mais seguros e eficazes.

Existem três gerações de vetores Ad (Figura 4.3.). Nos vetores de primeira geração, ocorre substituição da região do gene E1 pelo transgene, podendo haver também deleção do gene viral E3, com o objetivo de aumentar a capacidade do vetor viral. Estes vetores têm uma capacidade de transgene de até 8 kb, contudo induziam uma forte resposta por parte do sistema imunitário. Deste modo, surgiram os vetores de segunda geração. Nestes, para além da deleção dos genes E1 e E3, foram também eliminados os genes E2 e E4, o que se traduziu num aumento da persistência do transgene, assim como uma diminuição da resposta inflamatória. No entanto, estes não conseguiram resolver totalmente a questão da imunogenicidade assim como o problema de capacidade. (103) Os vetores de terceira geração, também designados como “*gutless vectors*” carecem de todos os genes virais, contendo apenas ITRs e o sinal de *packaging*  $\psi$ , o que lhes confere uma menor imunogenicidade quando comparados com os anteriores. Adicionalmente, apresentam uma maior capacidade transgênica, sendo possível a introdução de material genético não viral até 37 kb, como também permitem uma expressão do transgene a longo prazo e uma menor contaminação com partículas virais replicantes. (104)

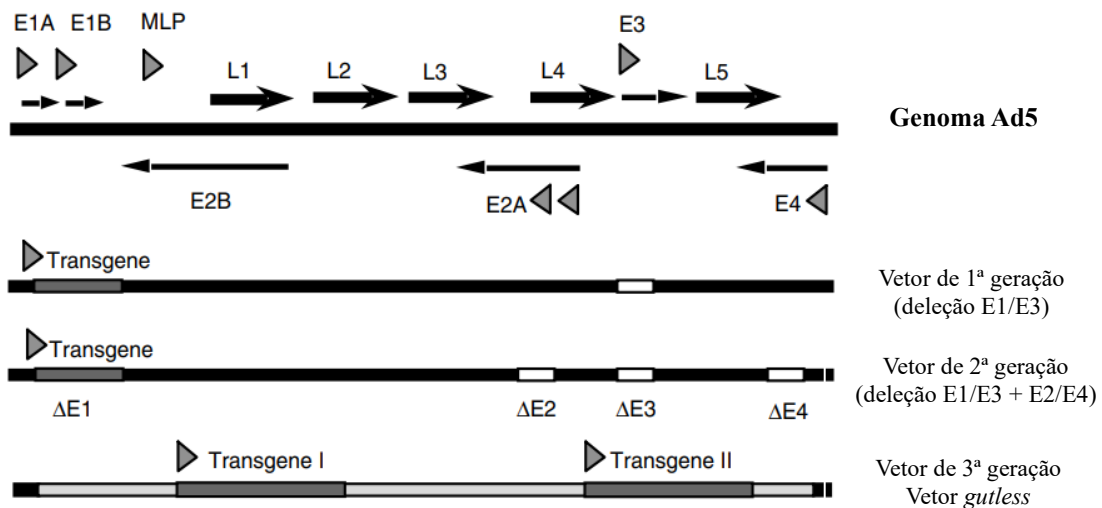


Figura 4.3. – Representação da organização genômica de um adenovírus do serotipo 5 (Ad5) e das diferentes gerações de vetores. Adaptado de (103)

#### d) Vírus Adeno-associados

Os vírus adeno-associados (Figura 4.4.) pertencem ao gênero *Dependovirus* e à família *Parvoviridae*, tendo sido descobertos em 1965 como contaminantes de isolados de AdV. (105) São vírus não envelopados e não patogênicos, de pequenas dimensões, possuindo um genoma de DNA de cadeia simples (ssDNA) com cerca 4,7 kb. (106) Para se replicarem e estabelecerem uma infecção viral produtiva, estes estão dependentes da co-infecção com outros vírus, estes últimos denominados vírus *Helper*, como por exemplo o adenovírus. (107)

Nas extremidades do genoma encontram-se duas sequências ITRs, que funcionam como origem e iniciadores da replicação. Fazem parte da estrutura do AAV, três genes, *Rep* (*Replication*), *Cap* (*Capsid*) e *aap* (*Assembly*). O gene *Rep* codifica as quatro proteínas não estruturais necessárias à replicação viral (Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40), enquanto o gene *Cap* codifica para as proteínas estruturais da cápside viral (VP1/VP2/VP3). Já o gene *aap* codifica para a proteína de ativação de montagem (AAP, do inglês *assembly activating protein*). (108,109)

No desenvolvimento de vetores AAV, ocorre substituição dos genes virais pelo gene terapêutico. Deste modo, as ITRs são as únicas sequências virais que permanecem aquando da produção do vetor, uma vez que são imprescindíveis à replicação e empacotamento do genoma. (Figura 4.4.) (41,107) Cada um dos serotipos de AAVs até agora identificados, interage com diferentes recetores das células hospedeiras. Assim, com base no tipo de células ou tecidos alvo, poder-se-á selecionar o serotipo mais adequado. Um dos primeiros serotipos de AAV identificado e caracterizado foi o AAV2, com tropismo para células nervosas, tumorais, células fotorreceptoras, epitélio pigmentar da retina e o único que apresenta especificidade para o rim. A maioria dos vetores utilizados atualmente em terapia génica faz uso das ITRs deste serotipo. (40,110)

Tal como os adenovírus, estes vírus também apresentam a capacidade de transduzir células em divisão e quiescentes, no entanto são menos imunogênicos que os anteriores e não são patogênicos, demonstrando, portanto, uma maior segurança. Como resultado, estes têm sido extensivamente utilizados em ensaios pré-clínicos, tal como em ensaios clínicos de terapia génica. (52) No entanto, os AAVs possuem uma reduzida capacidade transgênica, cerca de 4 kb, limitando, assim, os transgenes que podem ser transportados. (111)

Vários estudos de terapia génica *in utero*, têm caracterizado os AAVs em termos de segurança e eficácia a longo prazo, bem como realizado comparações com outros vetores virais. Uma terapia génica baseada em AAVs que expressavam o fator IX, administrada a primatas não humanos, resultou numa expressão génica de longo prazo sem toxicidade associada. (112) Num outro estudo *in utero*, realizado em ratinhos, observou-se que células pulmonares transduzidas com um vetor AAV2/9 a expressar GFP (*green fluorescent protein*), resultou numa expressão de até 6 meses. Contudo, o mesmo não se verificou aquando da utilização de vetores lentivírus. Apesar dos resultados promissores, a segurança associada ao vetor deve ser rigorosamente avaliada, bem como o potencial de integração do mesmo em ambiente fetal, antes de uma passagem para ensaios clínicos em fetos humanos. (8,113)

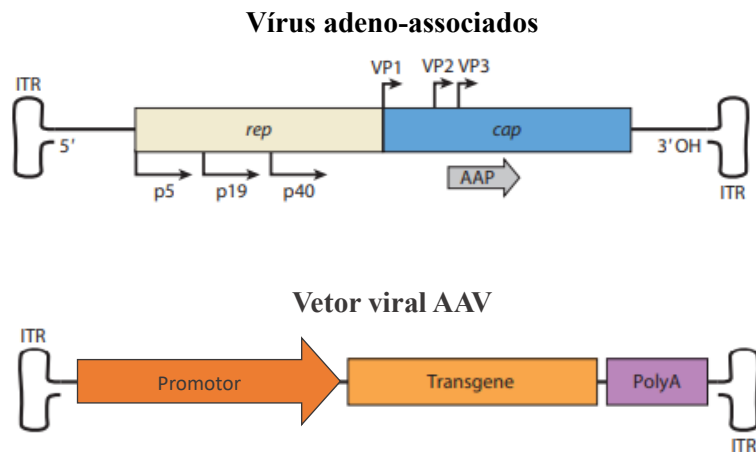


Figura 4.4. - Representação esquemática do genoma de um AAV e vetor viral derivado. Adaptado de: (99)

#### 4.1.2. Sistemas de Entrega Não-Virais

Os sistemas de entrega não virais englobam métodos físicos e métodos químicos que vão auxiliar a transferência do material genético exógeno para a célula alvo, facilitando a sua entrada e, conseqüente biodisponibilidade intracelular. Em comparação com os vetores virais, os presentes sistemas apresentam reduzida patogenicidade, menor risco de mutagênese por inserção, maior flexibilidade, uma vez que permitem a incorporação de transgenes sem restrição de tamanho, bem como uma maior facilidade e menor custo da sua produção em larga escala. Estes sistemas não virais tentam reproduzir a capacidade dos vírus como veículos de entrega, oferecendo uma maior segurança. Contudo, retratar o que um vírus faz naturalmente torna-se um grande desafio que tem levado ao desenvolvimento de diferentes estratégias. A escolha e o desenho do sistema não viral mais adequado irão depender do tecido ou célula alvo e do tipo de material genético terapêutico, bem como da eficácia e segurança do sistema de entrega. (41,114,115)

Estes vetores devem ser desenvolvidos de forma a ultrapassar as barreiras fisiológicas, devendo apresentar estabilidade suficiente para permitir a entrega da terapia ao alvo, o que requer proteção da degradação enzimática, bem como da exposição a componentes intersticiais do hospedeiro, como por exemplo, albumina e anticorpos. Uma vez no interior da célula alvo, devem conseguir resistir à degradação citoplasmática e conseguir chegar ao núcleo celular. (114)

##### a) Sistemas de Entrega Não-virais Físicos

Uma injeção de DNA isolado, não incluído num vetor (*naked DNA*), em tecidos ou administrada na circulação sistêmica apresenta-se como a plataforma de entrega mais simples no feto. No entanto, a eficácia da transfecção vai ficar comprometida devido à rápida degradação por nucleases e à eliminação pelo sistema mononuclear fagocítico. (116) De forma a ultrapassar este problema, surge a aplicação de métodos físicos. Estes alteram a permeabilidade da membrana celular, temporariamente, através da aplicação de forças físicas, permitindo a entrega intracelular do material genético. Neste procedimento vai ser importante o estabelecimento de um equilíbrio entre a eficiência da entrega do material genético à célula e o dano exercido sobre a mesma. (41) Seguidamente, são apresentados alguns dos sistemas não-virais físicos utilizados na transferência de genes.

A electroporação melhora a permeabilidade celular através da aplicação de impulsos elétricos. Estes vão destabilizar a membrana celular, sendo criados poros temporários que vão permitir a introdução do material genético na célula. (117) Os tecidos alvo mais frequentes são a pele, músculo e olhos, tendo este método também sido utilizado em tumores. Destaca-se também o sucesso deste método na entrega de material genético a nível do sistema nervoso central, quer no período pré-natal como pós-natal. (118) Relativamente ao seu sucesso *in utero*, apresenta-se um exemplo, onde a transferência de genes mediada por electroporação *in vivo* em ratinhos, recuperou parcialmente a audição e a função vestibular dos mesmos. (119) Destaca-se, aquando da realização deste procedimento, uma resposta imune e inflamação reduzidas, crescentes níveis de transferência e expressão de genes, aproximando-se dos de vetores virais, bem como o custo relativamente baixo. Contudo, existe o risco de choque elétrico para o feto. (8)

No caso do método de bombardeamento com partículas metálicas revestidas com ácidos nucleicos (*gene gun*), partículas de ouro ou de outros metais, revestidas com o DNA de interesse são expelidas a alta velocidade por um gás pressurizado (como por exemplo, o hélio) ou por descarga elétrica de alta voltagem com o objetivo de atingir profundamente o alvo e entregar o material genético exógeno. Contudo, a expressão dos genes é transitória e podem ocorrer danos celulares significativos associados à descarga. (120)

Já a sonoporação é uma técnica não invasiva e segura, que se baseia na transferência de genes mediada por ultrassom. O material genético terapêutico é incorporado dentro de microbolhas, pequenas esferas com gás, e administrado na circulação sistémica, sendo aplicado externamente ondas de ultrassom que vão permitir a permeabilização temporária da membrana celular, através da criação de pequenos poros na membrana, possibilitando a entrega intracelular do material genético. Geralmente, este procedimento é utilizado ao nível cerebral, da córnea, rins, cavidade peritoneal, tecidos musculares e cardíacos. (115)

Relativamente à entrega hidrodinâmica, o volume de DNA injetado vai criar uma pressão hidrodinâmica que vai aumentar a permeabilidade do endotélio capilar. Assim, ocorre formação temporária de poros na membrana plasmática que circunda as células do parênquima, permitindo a passagem do material genético por estes. Este método é mais frequentemente utilizado na terapia génica em células hepáticas. A sua eficácia vai

dependem da força hidrodinâmica aplicada, da estrutura do alvo, bem como dos capilares. (120,121)

#### b) Sistemas de Entrega Não-Virais Químicos

Para além do facto, de ao ser administrado *naked* DNA, este estar sujeito a degradação enzimática como também a eliminação por parte do sistema fagocítico, o DNA apresenta uma estrutura rica em grupos fosfato, o que lhe confere uma carga negativa, limitando, deste modo, a sua interação com lípidos aniónicos na membrana celular. De modo a ultrapassar este problema, o DNA pode formar complexos com lípidos ou polímeros carregados positivamente a fim de facilitar o seu transporte para dentro das células. Existem, assim, duas categorias de complexos: os lipoplexos e poliplexos, dependendo se foi usado um lípido ou polímero na sua formulação. (114,116,122)

Os sistemas de entrega de base lipídica estão entre os vetores não-virais mais amplamente utilizados. Os lípidos catiónicos são formados por cadeias alquílicas hidrofóbicas, ligadas por um grupo de ligação a um grupo polar. Exemplos destes são o DOTMA (*1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane*) e DOTAP (*1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane*). Estes ao condensarem com os ácidos nucleicos, protegem-nos da degradação enzimática e possibilitam a entrega destes à célula alvo por interação com a membrana celular carregada negativamente. Os lípidos catiónicos destacam-se pela baixa citotoxicidade e imunogenicidade, estrutura variável, apresentando uma alta capacidade transgénica, o que permite a entrega de ácidos nucleicos com um maior tamanho. São biodegradáveis e de fácil produção. Contudo, apresentam uma baixa eficiência de entrega do material genético, que se deve a uma fraca estabilidade e rápida eliminação. De modo a melhorar a mesma, podem-se modificar os constituintes dos lípidos, ou seja, os domínios hidrofóbicos, hidrofílicos ou o grupo de ligação destes domínios, podendo também ser adicionados outros componentes lipídicos tais como o fosfolípido DOPE ou o polietilenoglicol (PEG). (41,80,123-125)

Relativamente aos sistemas de base polimérica, os polímeros catiónicos interagem com os ácidos nucleicos carregados negativamente, originando poliplexos capazes de proteger o material genético e facilitar a entrega intracelular. Além disso, estes sistemas permitem a incorporação de diferentes ligandos de modo a melhorar a eficiência de entrega ao alvo. Comparativamente aos sistemas de entrega de base lipídica, os presentes

vetores, demonstram maior estabilidade, sendo que uma vez dentro da célula, a degradação progressiva do polímero permite controlar a taxa de libertação do material genético. Os polímeros utilizados na produção destes vetores podem ser divididos em: polímeros naturais, tais como, proteínas, péptidos, polissacarídeos; e em polímeros sintéticos, como por exemplo, poli-L-lisina (PLL), polietilenoimina (PEI, do inglês *Polyethyleneimine*), dendrímeros, sendo que estes últimos são os mais utilizados. (41,115)

## 5. Estratégias Terapêuticas

### 5.1. Transferência de Genes

Esta estratégia terapêutica envolve a substituição ou adição de genes. (Figura 5.1.) No caso da substituição de genes, uma cópia funcional do gene é entregue a células específicas com o fim de corrigir a disfunção celular causada por produtos genéticos ausentes ou não funcionais. Pode ocorrer diretamente *in vivo* ou através da correção de células *ex vivo*. A substituição de genes é uma abordagem simples para o tratamento de doenças monogênicas. Contudo, relativamente a doenças complexas com etiologia multifatorial, como doenças cardiovasculares ou do foro oncológico, e doenças infecciosas, a estratégia mais adequada é a adição de genes. Esta envolve a introdução de um gene com o fim de melhorar os sintomas da patologia em questão, e não pela correção de um gene defeituoso. (6,126)

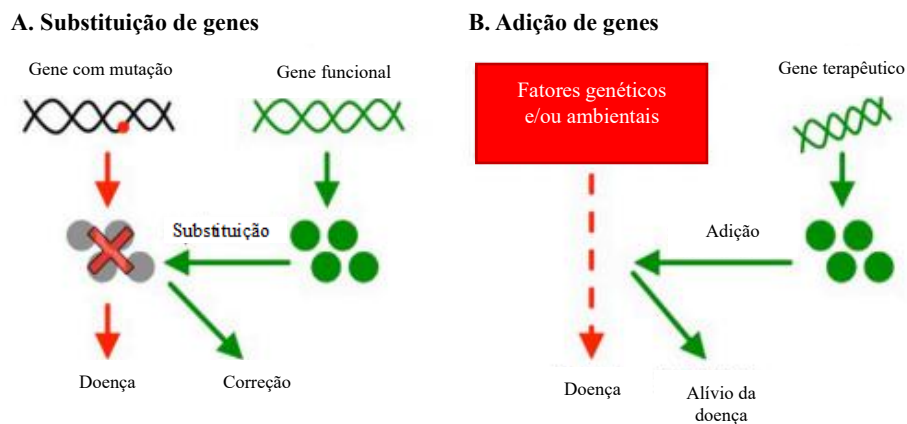


Figura 5.1. Representação da transferência de genes por substituição (A) e por adição (B). (A) Uma mutação genética num determinado gene anula a síntese de proteínas, levando ao desenvolvimento da doença. Ao fornecer uma cópia funcional do gene, vai ocorrer a produção de proteínas, permitindo a correção da patologia. (B) A exposição a múltiplos fatores genéticos e/ou ambientais pode levar ao desenvolvimento de determinada patologia. Ao ser adicionado um gene terapêutico que visa um aspeto específico da doença, possibilita-se o alívio da sintomatologia da mesma. Adaptado de (126)

## 5.2. Silenciamento de Genes

De um modo geral, o silenciamento de genes refere-se à redução da expressão de um ou mais genes, o que pode beneficiar no tratamento de várias doenças. Isto pode ser realizado com recurso a várias estratégias, como RNA de interferência (RNAi, do inglês *Interference RNA*), oligonucleotídeos *antisense* (ASOs, do inglês *Antisense Oligonucleotides*), ribozimas, aptâmeros, entre outros. Em seguida são abordados alguns destes mecanismos, nomeadamente o RNAi e ASOs, uma vez que se tratam dos mais utilizados no silenciamento da expressão genética. (127,128)

### 5.2.1. RNA de Interferência (RNAi)

O presente mecanismo foi identificado pela primeira vez em 1998, no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, tendo-se observado que moléculas de dsRNAs estavam envolvidas no silenciamento de genes. O RNAi é um mecanismo pós-transcricional de regulação da expressão genética, que ocorre naturalmente em organismos eucariotas, como mamíferos ou plantas. Este também é usado na resposta imune inata contra infeções por vírus ou bactérias. Este mecanismo vai depender da presença de moléculas de RNAi na célula, sendo que uma das cadeias é complementar com o mRNA alvo. São normalmente utilizados três tipos diferentes de moléculas de RNAi, siRNA (do inglês, *short interfering RNA*), shRNA (do inglês *short hairpin RNA*) e miRNA (do inglês, *microRNA*). (129-131)

O miRNA e o siRNA apresentam origens celulares diferentes, ou seja, enquanto os siRNAs podem ter origem endógena ou exógena (como por exemplo, por infeção viral), os miRNAs derivam do genoma. (132) Outra diferença entre estas moléculas está associada à complementaridade com as sequências alvo, sendo que os siRNAs apresentam maior complementaridade, ao contrário dos miRNAs. No citoplasma, ocorre o processamento de dsRNA em siRNA, mediado pela enzima Dicer. O siRNA é incorporado, posteriormente, no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA induced silencing complex*), onde vai ocorrer separação das duas cadeias de RNA. Uma das cadeias é degradada, enquanto a cadeia guia se liga à sequência de mRNA complementar através do complexo RISC. Após a ligação, ocorre degradação do mRNA ou o bloqueio da sua tradução. (Figura 5.2.) Relativamente ao miRNA, este é transcrito a partir do DNA em miRNA primário (pri-miRNA) no núcleo da célula. Em

seguida, é processado por duas proteínas, Pasha e Drosha, resultando num miRNA precursor (pré-miRNA). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma, onde é processado pela enzima Dicer, obtendo-se o miRNA. As etapas seguintes são idênticas àquelas que ocorrem com siRNA. (Figura 5.2.). (41,133) No caso dos shRNAs, estes são transcritos no núcleo celular e, em seguida, são processados pela enzima Drosha. Os pré-shRNAs resultantes são transportados para o citoplasma, onde vão sofrer a ação da enzima Dicer, formando siRNA de cadeia dupla que, posteriormente, vai ser incorporado no RISC. (Figura 5.2.) (131)

Deste modo, moléculas siRNAs vão apresentar como vantagem o facto de não ser necessário que estas atinjam o núcleo de forma a serem processadas e exercerem o seu efeito, comparativamente aos miRNAs e shRNAs. Contudo, estes últimos apresentam uma maior duração e capacidade de silenciamento de genes. (134,135)

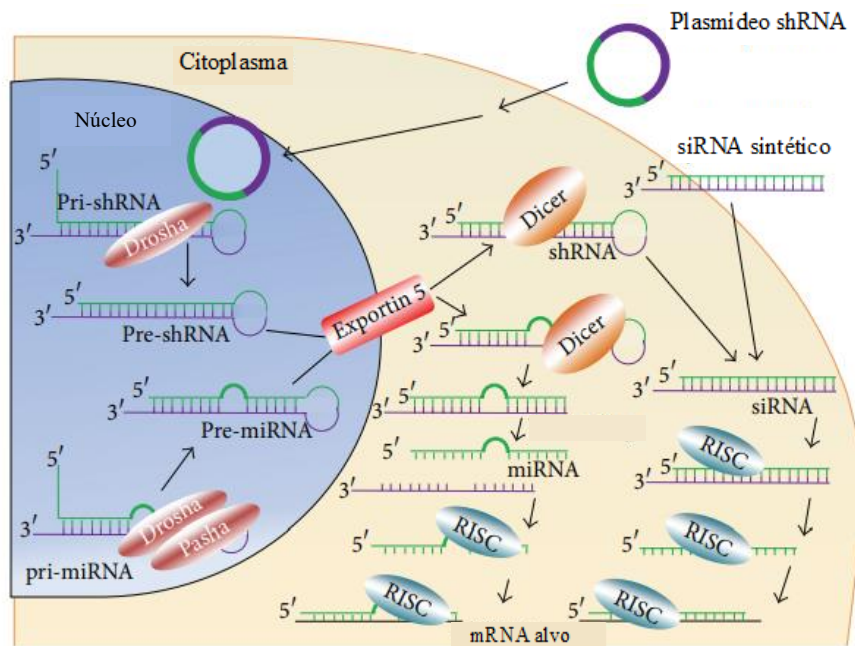


Figura 5.2. Representação esquemática de três vias do mecanismo de RNA interferência. Adaptado de (131)

### 5.2.2. Oligonucleotídeos *Antisense* (ASO)

Os oligonucleotídeos *antisense* caracterizam-se por serem sequências curtas de ácidos nucleicos de cadeia simples que se ligam por complementaridade ao RNA alvo, resultando numa alteração ou redução da expressão do mesmo. Esta estratégia permite assim, reduzir a expressão de proteínas com determinada mutação, como também restaurar a expressão proteica ou modificar proteínas. (136)

Uma vez que na sua forma não modificada, os ASOs são suscetíveis à rápida degradação por exonucleases e endonucleases, comprometendo o seu potencial terapêutico, surgiu a necessidade de introduzir modificações químicas nos mesmos, de modo a aumentar a sua biodisponibilidade, assim como melhorar a especificidade e afinidade para com o alvo. (137) Nos ASOs de primeira geração, ocorreu uma substituição de um átomo de oxigénio por um átomo de enxofre no grupo fosfato, o que possibilitou uma maior estabilidade e resistência à atividade das nucleases, bem como um maior tempo de semi-vida. (138) Os oligonucleotídeos de segunda geração, como por exemplo o 2'-O-metil (2'-OME) e 2'-O-metoxietil (2'-MOE), resultaram de modificações na posição 2' da ribose o que melhorou o seu perfil de segurança e eficácia. Contudo, alguns destes ASOs não conseguem recrutar a RNase H e, deste modo, induzir a degradação do mRNA, tendo de atuar por um outro mecanismo (bloqueio estereoquímico). (139,140) De modo a aumentar a resistência à degradação enzimática, bem como a estabilidade e a afinidade para com o alvo, uma terceira geração de ASO foi desenvolvida principalmente por modificações no grupo fosfato e no nucleosídeo. Estes incluem por exemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs, do inglês *Peptide nucleic acid*), oligómeros morfolino fosfordiamidato (PMOs, do inglês *Phosphorodiamidate morpholino oligomer*), ácido nucleico bloqueado (LNA, do inglês *Locked nucleic acid*). (138,141)

Esta estratégia terapêutica pode atuar por diferentes mecanismos (Figura 5.3.), o que vai depender da estrutura química do oligonucleótido, como também da molécula alvo. (136) Um dos mecanismos ocorre após a ligação do ASO ao RNA, levando ao recrutamento da RNase H, o que leva à degradação do mRNA alvo. Contudo, a RNase H requer um oxigénio livre na posição 2', desta forma os oligonucleotídeos que apresentam modificações nesta posição não conseguem induzir a regulação negativa do RNA alvo por meio da RNase H. Ou seja, apenas os oligonucleotídeos de primeira geração

conseguem atuar por este mecanismo. (142,143) Os ASOs que não recrutam a RNase H, podem atuar bloqueando a tradução de proteínas por ligação ao mRNA e impedindo a ligação ribossômica ou por modificação do processo de splicing do pré-mRNA. (144)

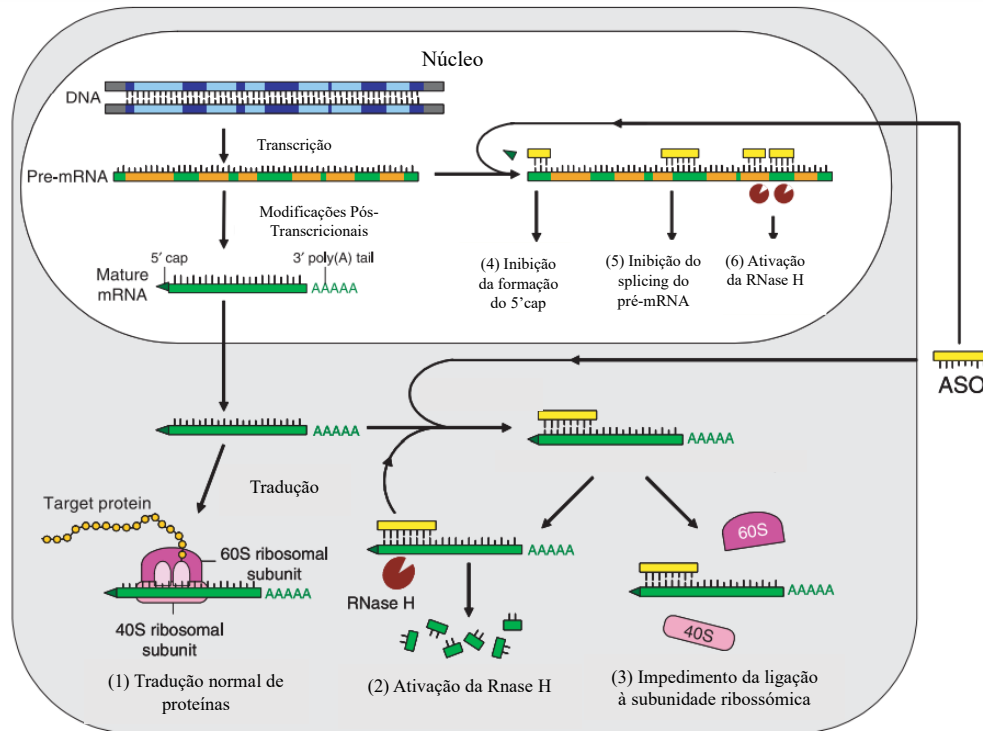


Figura 5.3. – Representação dos mecanismos de ação dos ASOs. (1) Tradução de proteínas na ausência de ASO. (2) No citoplasma, a formação do complexo ASO-mRNA pode induzir a ativação da RNase H, o que leva conseqüentemente à degradação do mRNA ou (3) bloquear a ligação à subunidade ribossômica, impedindo a tradução de proteínas. Em alternativa, o ASO pode entrar no núcleo e (4) inibir a formação de 5' cap, (5) inibir o splicing do mRNA ou (6) ativar a RNase H. Adaptado de (137)

Relativamente a esta estratégia, foi realizado um estudo *in utero* em murganhos, onde foi administrado ao dia gestacional 13-13,5, na cavidade amniótica, ASOs direcionado a um RNA não codificante, MALAT1 (do inglês, *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*), com o objetivo de verificar a eficácia da entrega e terapia, isto é, se o ASO conseguia regular negativamente o MALAT1 quando entregue *in utero*. Esta estratégia a visar o MALAT1 foi escolhida, uma vez que este é expresso em muitos tecidos, mas dispensável em murganhos, tendo-se verificado anteriormente que o ASO reduzia efetivamente os níveis de RNA MALAT1 quando administrado sistemicamente. Este procedimento resultou numa redução significativa do RNA MALAT1 no rim, fígado

e ouvido interno de murganhos neonatais, tendo o efeito persistido no fígado por pelo menos 4 semanas após o nascimento. Uma vez que a entrega desta terapêutica resultou numa regulação negativa significativa do RNA MALAT1 no ouvido interno, foi também administrado de forma semelhante um ASO visando o pré-mRNA gerado a partir de uma forma mutada do gene *Ush1c*, *Ush1c c.216G>A*. Esta mutação origina um local de splicing novo que vai ser utilizado, ao invés do correto, o que resulta num splicing defeituoso e síndrome de Usher em humanos e murganhos. A síndrome de Usher é uma doença genética que afeta simultaneamente a visão e a audição. O presente estudo demonstrou corrigir o splicing do pré-mRNA de *Ush1c.216A* no ouvido interno de murganhos neonatais. Deste modo, ambos os estudos demonstram o potencial de regulação da expressão genética aquando da utilização de ASOs no período pré-natal. (145-148)

### 5.3. Edição de Genes

Em alternativa às estratégias anteriores surge a edição genética. Esta permite a inserção, deleção ou substituição de nucleótidos num local específico do genoma da célula, anulando, deste modo, o risco de mutagenese por inserção, bem como de expressão transgénica não controlada, o que se torna uma vantagem comparativamente às estratégias convencionais. Esta edição dos genes pode ser realizada em células *ex vivo* ou pode ser entregue *in vivo*, com o fim de editar o genoma *in situ*. (54,149) O presente procedimento é realizado com recurso a nucleases, enzimas que se vão ligar ao DNA com diversos graus de especificidade e induzir uma quebra em ambas as cadeias da molécula. A quebra do DNA vai então estimular os mecanismos de reparação do hospedeiro, como a união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) ou a recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*). (Figura 5.4.) A NHEJ envolve a ligação das duas extremidades livres de DNA e é um processo que está sujeito a erros, levando muitas vezes a inserções ou deleções de nucleótidos no local de quebra (mutação *indel*), o que resulta em mutações *frameshift* originando muitas vezes o silenciamento do gene. Já no caso da reparação por HR, é fornecido um molde de uma sequência homóloga para que o reparo ocorra, permitindo a reconstituição completa da sequência alvo. Deste modo, enquanto a NHEJ pode ser utilizada para silenciar ou corrigir

o gene alvo, a HR pode ser usada para corrigir um gene já existente ou adicionar um novo. (43,150,151)

As nucleases de edição genética vão ser constituídas por um domínio de reconhecimento da sequência alvo (por exemplo, RNA guia no sistema CRISPR/Cas9) e uma nuclease. (152) Atualmente, as diferentes nucleases utilizadas na edição de genes são nucleases dedos de zinco (ZFNs, do inglês *zinc finger nucleases*), nucleases efetoras semelhantes a ativadores da transcrição (TALENs, do inglês *transcription activator-like effector nucleases*) e o sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespçadas (CRISPR/Cas9, do inglês *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*). (Figura 5.4.) Estas vão variar na sua complexidade, atividade, especificidade, bem como facilidade de produção. (151)

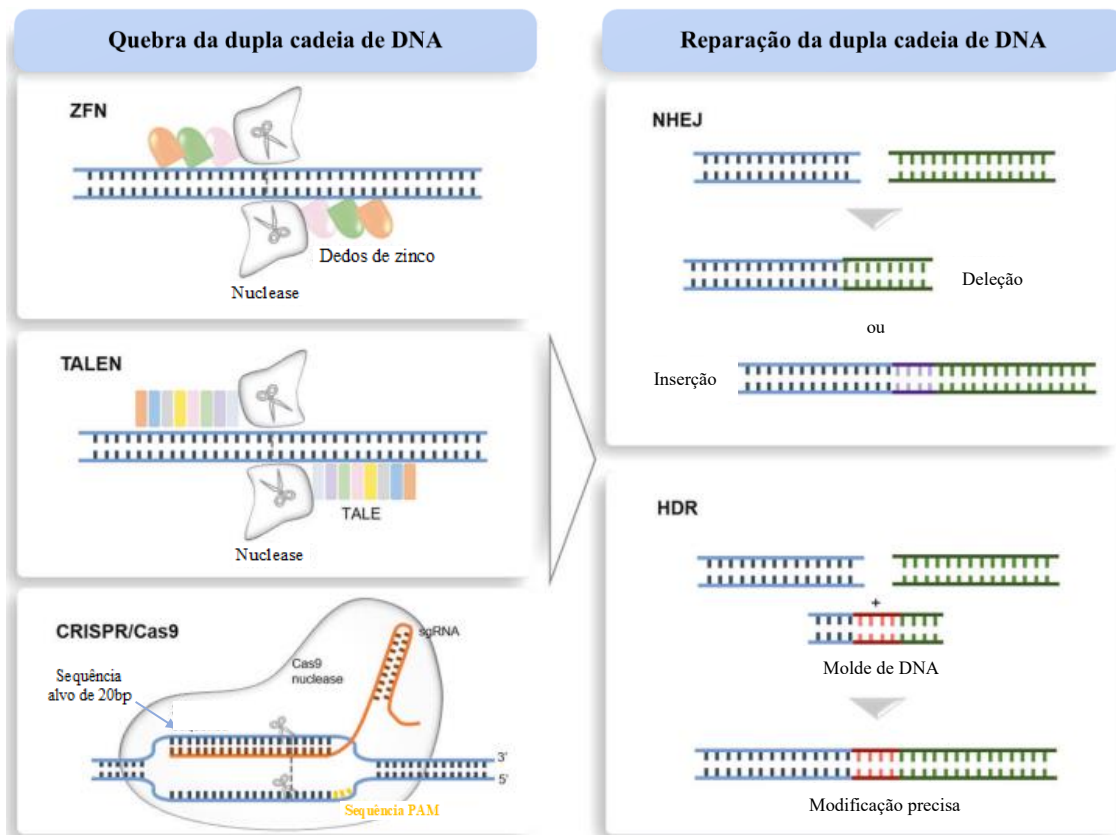


Figura 5.4. – Tipos de nucleases utilizadas na edição genética e os diferentes mecanismos de reparação do DNA do hospedeiro. As nucleases de edição genética (ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas9) induzem quebras na dupla cadeia do DNA em locais alvo. A quebra do DNA vai estimular os mecanismos de reparação do hospedeiro, a NHEJ ou HR. Adaptado de (153)

### 5.3.1. Nucleases Dedos de Zinco (ZFNs)

As nucleases dedos de zinco são constituídas por um domínio estrutural em dedos de zinco responsável pela ligação ao DNA e um domínio com atividade de nuclease, correspondente ao enzima de restrição FokI, que vai induzir a quebra da dupla cadeia do DNA. Cada unidade de dedo de zinco reconhece uma sequência de DNA de 3 pares de bases (bp, do inglês *base pairs*), deste modo, podem constituir a nuclease diferentes unidades de dedo de zinco, de modo a permitir que a mesma atue numa sequência alvo específica. Contudo, o facto de cada gene alvo requerer uma construção única da nuclease torna-se dispendioso e complexo. Outra desvantagem associada a este tipo de nuclease, reside no facto de, embora a ZFN possa ter uma alta afinidade para a sequência alvo, pode ocorrer ligação fora do alvo e, conseqüentemente, a quebra de outras sequências de DNA, o que pode resultar numa modificação não intencional do genoma. (151,154,155)

### 5.3.2. TALENs

As TALENs apresentam um domínio da nuclease da enzima de restrição FokI, tal como as nucleases anteriores, e um domínio de ligação ao DNA, TALE, semelhante ao encontrado em proteínas descobertas inicialmente em bactérias patogénicas *Xanthomonas campestris*. O domínio de ligação ao DNA contém várias subunidades com um comprimento de 34-35 aminoácidos, cada uma das quais reconhece um único par de bases de DNA. A especificidade do domínio de ligação ao DNA vai ser determinada por dois aminoácidos hipervariáveis que se encontram na posição 12 e 13 da sequência de aminoácidos, denominados díresíduos variáveis de repetição (RVDs, do inglês *repeat-variable di-residues*). Desta forma, a utilização das nucleases em questão, seria mais vantajosa em termos de facilidade e custo de produção, comparativamente às ZFNs, uma vez que para alcançar a especificidade ao alvo apenas é necessário variar os RVDs e não o resto da estrutura da nuclease. Assim como as ZFNs, as TALENs vão induzir uma quebra específica na dupla cadeia de DNA e ativar os mecanismos de reparação do DNA do hospedeiro, resultando em mutações *indel* ou permitindo a substituição de nucleótidos específicos na sequência de DNA, se for fornecido um molde de uma sequência homóloga aquando da reparação. (151,155,156)

### 5.3.3. CRISPR/Cas9

A tecnologia CRISPR foi inicialmente descoberta em bactérias, como um mecanismo de defesa contra infecções virais. Após uma primeira infecção por um bacteriófago, por exemplo, estas inseriam uma sequência genética parcial da fonte de infecção nos seus próprios genomas, com o propósito de se defenderem contra posteriores infecções. Esta tecnologia foi posteriormente adaptada, por demonstrar potencial na edição de genes de células eucarióticas, permitindo a quebra de DNA em locais de interesse. (157)

Existem três tipos de sistemas CRISPR/Cas (I, II e III). Ao contrário dos outros sistemas que requerem múltiplas proteínas Cas, o sistema tipo II necessita de apenas uma proteína, Cas9, derivada do *Streptococcus pyogenes* (SpCas-9). (158-160) O sistema CRISPR/Cas9 compreende um RNA guia único (sgRNA) e uma endonuclease Cas9. O sgRNA é composto por uma sequência CRISPR RNA (crRNA), sequência de 20 nucleótidos semelhante à sequência do DNA alvo, o que permite direcionar a nuclease ao alvo, e o trans-ativador CRISPR RNA (tracrRNA) que liga a endonuclease ao crRNA. (161,162) Assim, o sgRNA ao ser complementar, vai-se ligar à sequência de DNA alvo, que termina com uma sequência curta de DNA, PAM (do inglês, *protospacer adjacent motif*), essencial para a ligação da Cas9. (163) A endonuclease vai então quebrar a dupla cadeia de DNA, ativando os sistemas de reparação de DNA do hospedeiro, ocorrendo reparação por NHEJ ou por recombinação homóloga. O primeiro mecanismo, NHEJ, é o mais ativo e não requer que as células estejam em proliferação. No caso de serem induzidas, em dois locais díspares do DNA, duas quebras de cadeia dupla através de dois sgRNAs diferentes, pode ocorrer a deleção do segmento intermediário, o que poderá ser útil quando se quer eliminar um segmento prejudicial ou restaurar um quadro de leitura alterado. Já o mecanismo HR, mostra-se menos eficiente e exige células em divisão, contudo permite a introdução de alterações genéticas mais específicas. (10,164)

Recentes progressos no campo da edição genética, permitiram o desenvolvimento de abordagens mais eficientes e seguras, como é o caso da edição de bases ou edição prime. A primeira, baseia-se na tecnologia CRISPR, na qual uma Cas9 incapaz de produzir quebras na dupla cadeia de DNA é conectada a uma enzima de edição de nucleótidos, como por exemplo, uma adenosina desaminase ou uma citosina desaminase. O sgRNA vai direcionar o editor de bases para um local específico no genoma e este

último vai converter a citosina em timina, se a enzima de edição for uma citosina desaminase, ou adenina em guanina, no caso da adenina desaminase. Este procedimento permite a alteração de bases específicas num local específico, sem ocorrer quebras na dupla cadeia de DNA, nem sendo necessário que as células se encontrem em divisão. (52,165,166) A edição prime permite uma edição precisa de inserções, deleções e substituições de bases, sem a necessidade de uma indução de quebra da dupla cadeia de DNA. Consiste numa nCas9 (H840A) conjugada com uma transcriptase reversa modificada e um RNA guia de edição prime (pegRNA), que serve como modelo para a transcriptase reversa e codifica a modificação pretendida. Contudo, esta tecnologia é relativamente recente, necessitando de desenvolvimento e pesquisas adicionais em termos de estratégias de entrega e aumento da eficiência da tecnologia. (167)

O sistema CRISPR/Cas9 veio, portanto, revolucionar a edição genética, permitindo uma maior facilidade de produção, em comparação com as plataformas de edição genética mencionadas nos pontos anteriores, ZFNs e TALENs. Contudo, é importante ressaltar que em comparação com a transferência de genes, a presente estratégia terapêutica, particularmente aquela baseada no sistema CRISPR/Cas9, se encontra ainda na sua “infância” em termos de desenvolvimento e prática clínica, embora vários ensaios clínicos estejam em fase de desenvolvimento ou tenham sido concluídos, no período pós-natal. (149)

#### 5.3.3.1. Edição de Genes no Período Pré-natal

Apesar de a maioria dos estudos de terapia génica *in utero* se concentrar na transferência de genes como estratégia terapêutica, os progressivos avanços na tecnologia de edição génica, como o CRISPR-Cas9, despertaram o entusiasmo pela sua possível utilidade antes do nascimento. No entanto, neste período, é fundamental que a entrega da tecnologia de edição genética seja direcionada ao alvo. Se tal se garantir, a presente estratégia tem um enorme potencial no tratamento de algumas doenças genéticas pela modificação permanente do gene através de um único tratamento, antes da irreversibilidade da patologia. (8,10)

De modo a demonstrar o potencial desta abordagem, até ao presente momento, já foram realizados alguns estudos *in utero* que recorreram a vetores adenovirais como sistema de entrega da tecnologia de edição genética, uma vez que estes possuem uma

maior capacidade transgênica, como também permitem uma transdução eficiente em vários tipos de células. (8) Um dos primeiros estudos *in utero*, recorreu a um vetor adenoviral como sistema de entrega do editor de base 3 (BE3), editor de base de citosina baseado em SpCas9, com o objetivo de introduzir uma mutação *nonsense* no gene Hpd num modelo de murgancho com tirosinemia hereditária tipo 1 (HT1, do inglês *Hereditary tyrosinemia type I*). (77) Esta é uma doença hereditária autossômica recessiva causada pela deficiência de fumarilacetoacetase, a última enzima na via de degradação da tirosina. Como resultado formam-se metabolitos tóxicos que se vão acumular nos hepatócitos e nas células dos túbulos contornados proximais, resultando em lesão hepática e renal. O tratamento disponível atualmente é o 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoi) -1,3-ciclohexanediona (nitisona ou NTBC) em combinação com uma dieta pobre em tirosina. NTBC atua inibindo a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPD), uma enzima da segunda etapa da via de catabolismo da tirosina, o que evita o acúmulo de metabolitos tóxicos, traduzindo-se numa melhoria clínica. Contudo, alguns doentes, mesmo a fazer tratamento com NTBC, desenvolvem hepatocarcinoma, necessitando assim de transplante hepático, o que torna necessário o desenvolvimento de outras terapêuticas. (168-171) No estudo acima, a edição do gene Hpd, que codifica para a enzima anteriormente mencionada, permitiu a melhoria da função hepática e o resgate do fenótipo letal da HT1, ao evitar o acúmulo de metabolitos tóxicos pela via de degradação da tirosina. Foi também observada, até aos 3 meses após a edição, uma taxa de edição dos hepatócitos significativamente superior nos murganchos tratados *in utero*, comparativamente àqueles tratados no período pós-natal, o que pode estar associado, neste último caso, a níveis circulantes elevados de anticorpos anti-Ad e anti-SpCas9 afetando deste modo, a estabilidade da edição. O facto de o mesmo não ter acontecido nos murganchos tratados *in utero*, remete para a tolerância do ambiente fetal que se torna vantajosa ao permitir uma maior eficácia da terapêutica. (77)

Num outro estudo, utilizou-se um modelo animal de murgancho que expressava uma mutação no gene que codifica a proteína surfactante C, Sftpc<sup>I73T</sup>, que causa doença pulmonar intersticial infantil. A pró-proteína SP-C<sup>I73T</sup>, quando expressa em murganchos durante a embriogénese, interrompe o desenvolvimento pulmonar, causando rápida morte perinatal. No presente estudo, utilizaram também um sistema de entrega adenoviral, para deleção do gene mutante Sftpc<sup>I73T</sup> por tecnologia CRISPR-Cas9 e reparação por NHEJ, em fetos de murgancho no 16º dia de gestação. (Figura 5.5.) Isto preveniu o acúmulo da

pró-proteína, melhorando o desenvolvimento pulmonar e, por sua vez aumentando a sobrevivência destes murganhos. Neste caso, não foi necessária a restauração da expressão de Sftpc, pois esta não é necessária para a sobrevivência dos murganhos, bastando a deleção do gene  $Sftpc^{173T}$  para aumentar a sua sobrevivência. Mas, no caso do tratamento em humanos a correção da mutação no gene  $Sftpc^{173T}$  seria preferível à sua deleção. Apesar disto, este estudo demonstra a aplicabilidade da edição genética *in utero* no tratamento de doenças pulmonares congénitas resultantes de defeitos no epitélio pulmonar. (172,173)

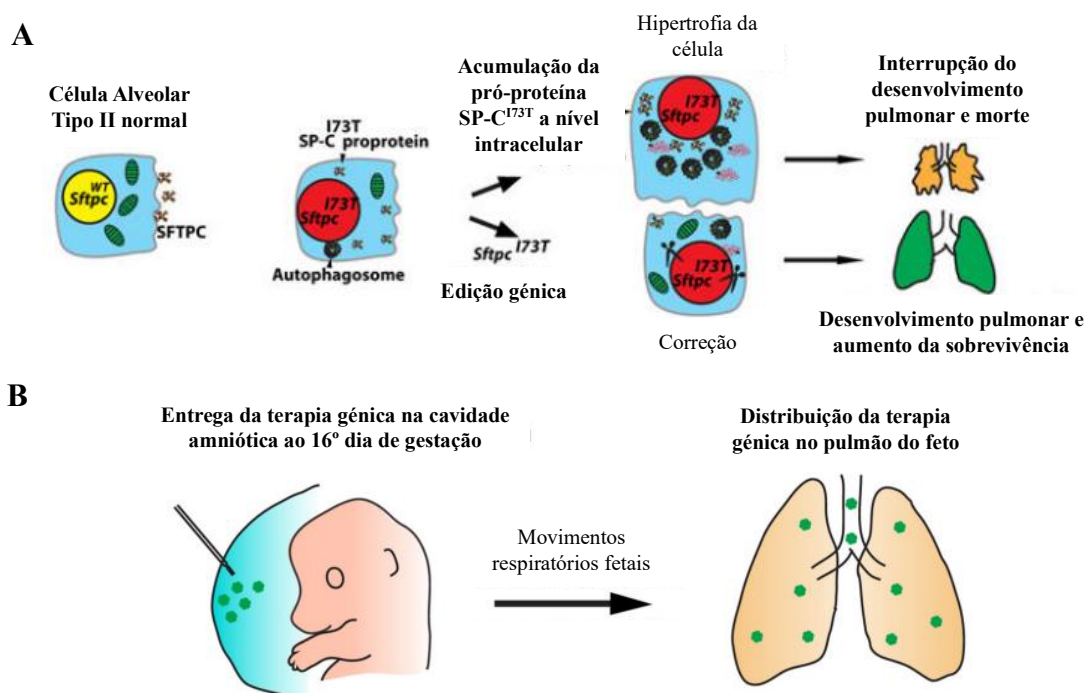


Figura 5.5. Edição genética *in utero* melhora fenótipo de uma patologia pulmonar. (A) A mutação  $Sftpc^{173T}$  causa um acúmulo da pró-proteína SP-C<sup>173T</sup> a nível intracelular, o que resulta na lesão de células alveolares tipo 2. A deleção do gene  $Sftpc^{173T}$  por tecnologia CRISPR-Cas9 pode corrigir o fenótipo disfuncional destas células e aumentar a sobrevivência dos murganhos. (B) Representação esquemática da entrega da terapia genética na cavidade amniótica para edição de genes pulmonares fetais. Adaptado de (173)

Ambos os estudos acima reconheceram as limitações associadas aos adenovírus, nomeadamente a imunogenicidade, o que se traduz numa barreira à sua utilização. No entanto foram apontados sistemas de entrega alternativos que fornecem uma maior segurança, como por exemplo, os vetores AAV ou mesmo, os sistemas de entrega não

virais. Estes últimos, apresentam potencialidade na entrega da tecnologia de edição de genes *in utero*, pois possuem uma baixa imunogenicidade e alta capacidade de transporte.

(8) Neste âmbito, foi realizado um estudo, que envolveu a entrega *in utero* de nanopartículas poliméricas de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), contendo ácidos nucleicos peptídicos e DNA doador, com o fim de atingir HSCs para correção da mutação no gene da  $\beta$ -globina num modelo de murganho com  $\beta$ -talassémia. Os PNAs vão atuar formando uma estrutura de tripla hélice com o DNA alvo, o que vai ativar os mecanismos de reparação endógenos do DNA, sendo que estes vão utilizar o DNA doador como molde para a correção da mutação. A utilização deste procedimento permite, por sua vez, uma redução da edição fora do alvo, devido à especificidade da ligação do PNA como também pelo facto de não se utilizarem nucleases exógenas, pois quando estas são utilizadas para induzir uma quebra na cadeia dupla do DNA, o mecanismo de reparação mais provável de atuar é o NHEJ, que está mais propenso a erros. Após o nascimento, foi observada uma elevação sustentada dos níveis de hemoglobina no sangue para níveis normais, uma redução na contagem de reticulócitos, reversão da esplenomegalia e aumento da sobrevivência. (Figura 5.6.) Adicionalmente, não foram detetadas mutações fora do alvo. Em adição, comparativamente ao tratamento em murganhos adultos, onde se verificou, após 4 tratamentos, uma taxa de edição de 4% em células da medula óssea e 7% em HSCs, com um único tratamento de menor dose *in utero*, verificou-se uma taxa de edição relativamente superior, cerca de 6% em células da medula óssea e 10% em HSCs. A realização deste procedimento no feto tem a vantagem de possibilitar o acesso à divisão de populações de células estaminais e progenitoras, o que permite a propagação do gene corrigido para todas as células descendentes e uma maior eficiência de edição. Este estudo demonstra assim, a aplicabilidade desta estratégia terapêutica no tratamento de hemoglobinopatias. (76,174)

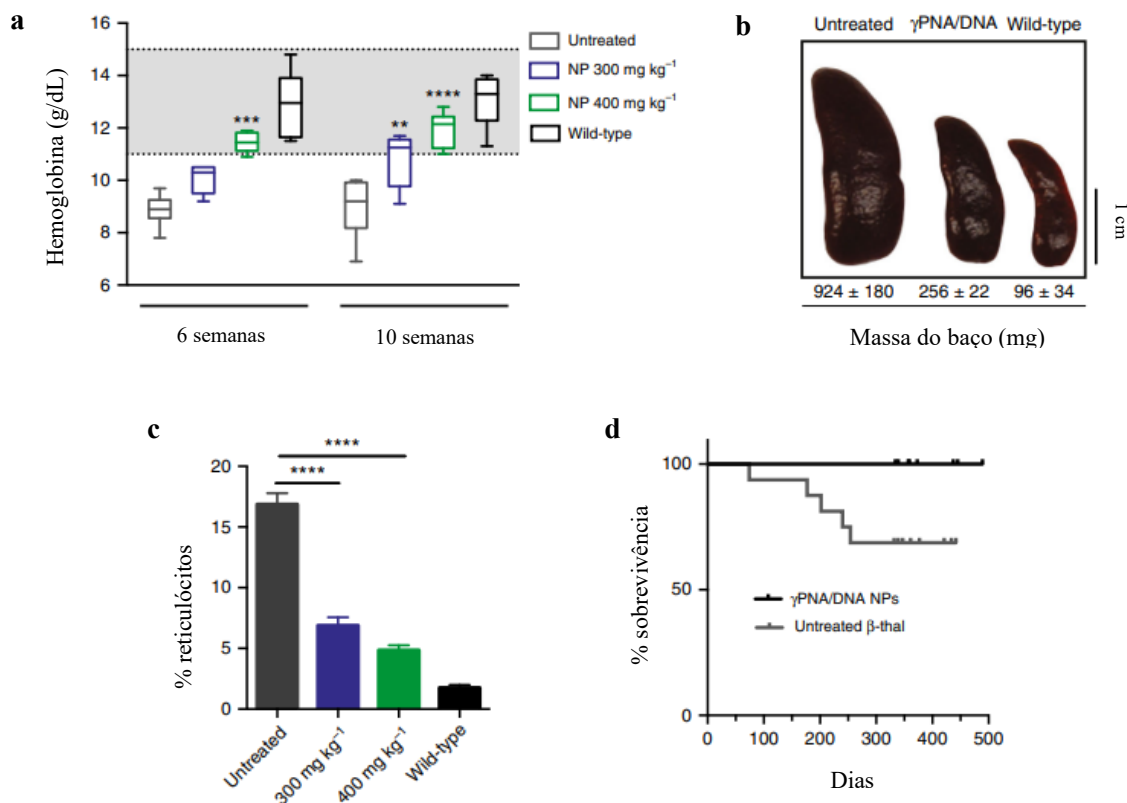


Figura 5.6. – Resultados obtidos após administração intravenosa de nanopartículas  $\gamma$ PNA/DNA em fetos de murganhos com  $\beta$ -talassémia, no dia de gestação 15.5. (a) Níveis de hemoglobina no sangue nos diferentes grupos de tratamento em estudo, às 6 e 10 semanas de idade.  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ ,  $****P < 0,0001$ . (b) Imagens dos baços dos diferentes grupos em estudo, bem como a sua massa, após 15 a 30 semanas do tratamento. (c) Percentagem de reticulócitos nos diferentes grupos em estudo,  $****P < 0,0001$ . (d) Sobrevivência de murganhos tratados *in utero* com nanopartículas  $\gamma$ PNA/DNA, comparativamente com o grupo controlo não tratado. Adaptado de (76)

Como demonstrado pelos estudos acima mencionados, a edição génica no período pré-natal apresenta diversas vantagens, nomeadamente uma edição sustentada em comparação com dados pós-natais, ao aproveitar as propriedades normais do desenvolvimento fetal, bem como permitir o tratamento da patologia antes do nascimento e da irreversibilidade da mesma, patologias estas que podem ser fatais no período perinatal, aumentando a taxa de sobrevivência e a qualidade de vida. Contudo, vários aspetos devem ser considerados antes da passagem desta terapêutica para ensaios clínicos, como a possibilidade desta intervenção poder afetar também a progenitora e não apenas o feto, o que não é pretendido neste caso. Portanto, as técnicas de administração e os sistemas de entrega devem ser otimizados de modo que esta exposição não ocorra. Outro

ponto a considerar é a distinção entre a edição genética de células somáticas *in utero* do meio ao final da gestação, apresentado acima, e a edição genética embrionária pré-implantação. Na edição genética embrionária pré-implantação a mutação é conhecida e corrigida *ex vivo*, seguindo-se a implantação na progenitora, o que evita a exposição da tecnologia a esta. Contudo, esta frequentemente altera a linha germinativa, sendo muitas vezes o pretendido. A edição génica no final da gestação, por sua vez, permite corrigir mutações *de novo* ou mutações mais tardiamente diagnosticadas na gravidez, bem como possibilita uma edição mais específica para uma determinada população celular ou órgão-alvo. Para além disto, evita a edição de células germinativas. (52,173)



## 6. Doenças candidatas à Terapia Génica Pré-natal

Apesar desta terapêutica se mostrar vantajosa relativamente às restantes, a realização da terapia génica pré-natal só deve ser considerada se os seguintes pré-requisitos forem cumpridos:

- a) O diagnóstico pré-natal deve ser preciso e confiável, e haver uma relação fenótipo/genótipo que se correlaciona com o prognóstico clínico;
- b) Há uma necessidade de intervir durante o desenvolvimento fetal, de modo a prevenir danos causados pela patologia ou as características fisiológicas e/ou imunológicas únicas do feto oferecem vantagens e/ou benefícios relevantes em relação aos tratamentos pós-natais oferecidos;
- c) Para que a doença seja considerada para tratamento com terapia génica, esta deve resultar em morbidade e/ou mortalidade fetal grave, tanto *in utero* como após o nascimento, não devendo estar associada a outras anomalias ou distúrbios graves que possam ser corrigidos pelo gene terapêutico;
- d) Por último esta terapêutica não deve limitar-se apenas a patologias com morbidade fetal grave, mas também deve incluir aquelas para as quais as terapias pós-natais disponíveis produzem resultados desfavoráveis, são limitadas financeiramente ou são dificultadas por respostas imunológicas e/ou rejeição. (38)

Adicionalmente, é de extrema importância um conhecimento técnico relativamente à administração da terapia fetal, esta técnica deve ser viável. Dada a vasta experiência das intervenções cirúrgicas fetais, tal não deverá ser limitante. (32)

Embora a terapia génica pós-natal seja estudada há vários anos, existindo, atualmente, vários ensaios clínicos a decorrer e, tendo sido já aprovados alguns medicamentos com base nesta terapia, ainda não existe um ensaio clínico relativo à terapia génica fetal. Como tal, informações relativas à eficácia, segurança e benefícios desta terapêutica no período pré-natal provém de estudos pré-clínicos realizados, principalmente, em murganhos, ovelhas e primatas não humanos, estes últimos em menor extensão. O modelo animal mais predominantemente utilizado tem sido o murganho devido ao seu curto período gestacional, abundância de modelos de doenças que mimetiza e o baixo custo. (7,11) No presente capítulo, serão apresentadas as doenças candidatas a

esta terapia (Figura 6.1.), tal como estudos pré-clínicos feitos nesse sentido, destacando as vantagens associadas a esta terapêutica no feto em comparação ao período pós-natal.

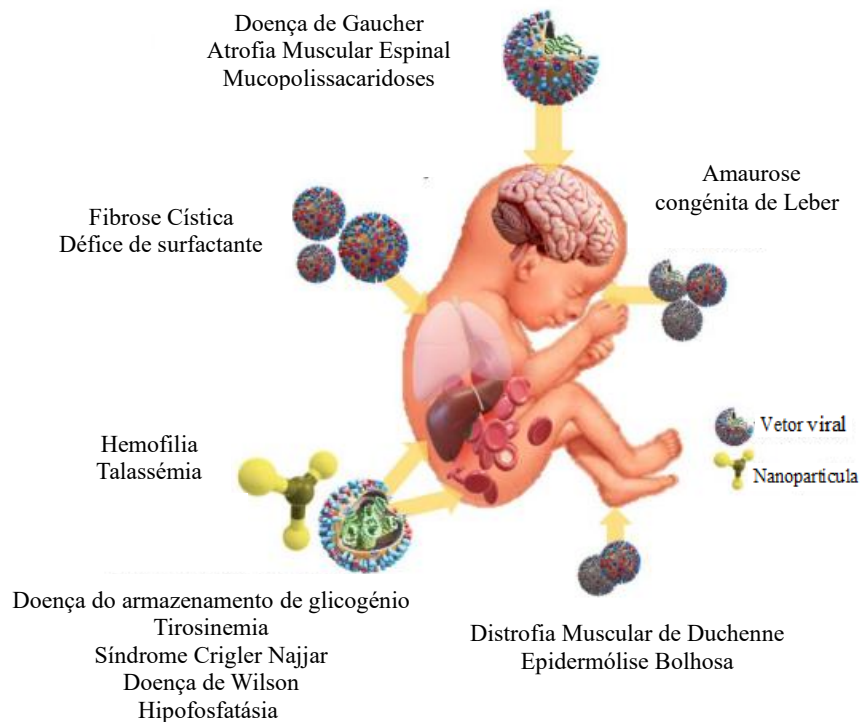


Figura 6.1. – *Exemplos de doenças candidatas à terapia gênica pré-natal.* Vários modelos de doenças já foram tratados parcial ou completamente *in utero*, tendo como alvo órgãos específicos ou por administração sistêmica. Adaptado de (3)

## 6.1. Doenças Neuromusculares

### 6.1.1. Atrofia Muscular Espinal

A atrofia muscular espinal (SMA, do inglês *Spinal muscular atrophy*) é uma doença autossômica recessiva, que se caracteriza por uma degeneração progressiva dos neurónios motores  $\alpha$  das células do corno anterior da medula espinal, resultando em fraqueza e atrofia muscular progressiva e, nos casos mais graves, paralisia. Foi estimada uma prevalência de cerca de 1–2 casos de SMA por 100.000 indivíduos e uma incidência de 1 caso por 10.000 nados vivos. (175) A maioria dos casos resulta de uma deleção homozigótica ou de mutações pontuais no gene SMN1 (do inglês, *survival motor neuron 1*), localizado no cromossoma 5q13 e, retenção de uma ou mais cópias do gene SMN2

(do inglês, *survival motor neuron 2*), resultando numa perda de expressão da proteína SMN (do inglês *survival motor neuron*), essencial no desenvolvimento dos neurónios motores. O gene SMN2 encontra-se no mesmo cromossoma, codificando para a mesma proteína, mas em níveis inferiores. Este difere do gene SMN1, num único par de bases (C → T) no exão 7, o que vai resultar num splicing alternativo do pré-mRNA, ocorrendo a remoção do exão 7. O mRNA resultante vai ser traduzido, resultando numa proteína truncada e instável, que é rapidamente degradada. No entanto, uma pequena percentagem de transcritos do SMN2 retém o exão 7 após o splicing, o que resulta na produção de SMN. Assim o gene SMN2 pode desempenhar um papel modificador na doença. (176,177)

De acordo com a idade de início, apresentação clínica e gravidade da patologia, esta pode ser classificada em 5 tipos diferentes: tipos 0, I, II, III e IV. SMA do tipo 0, inicia-se ainda durante o período pré-natal e constitui a forma mais grave da doença. Os doentes necessitam de suporte respiratório intensivo e costumam morrer em semanas. A forma mais comum da doença é a SMA do tipo I e inicia-se antes dos 6 meses de idade. Estas crianças nunca conseguem sentar-se sem apoio e normalmente morrem nos primeiros 2 anos de vida. A SMA do tipo II tem um início entre 6 e 18 meses de idade e apresenta uma gravidade intermédia. As crianças afetadas podem sentar-se sem apoio e a maioria destes indivíduos vive até à idade adulta, embora com incapacidade substancial. O tipo III ocorre mais frequentemente por volta dos 3 anos de idade. Os doentes conseguem adquirir a marcha e têm uma expectativa de vida normal, embora com considerável fraqueza neuromuscular. Finalmente, a SMA do tipo IV, tem início na idade adulta, com uma expectativa de vida normal. (178)

Atualmente existem três medicamentos à base de terapia génica aprovados para o tratamento da SMA no período pós-natal. *Spinraza* (Nusinersen) e *Evrystdi* (Risdiplam), ambos vão atuar modificando o splicing do gene SMN2, com o propósito de reter o exão 7 e, assim, aumentar a produção da proteína SMN, enquanto o *Zolgensma* (onasemnogene abeparvovec) é uma terapia génica com base no vetor viral AAV9 contendo o gene SMN1. Apesar destas três terapêuticas apresentarem via de administração e biodistribuição distintas, todas demonstraram o mesmo resultado, que a administração precoce é substancialmente mais eficaz do que a administração após o início dos sintomas. (179,180) Tendo em consideração que os tipos mais graves de SMA surgem durante a gestação ou logo após o nascimento, torna-se racional, o desenvolvimento de uma terapia

génica pré-natal. De modo a verificar o potencial da terapia génica durante a gestação, foram realizados os seguintes estudos *in utero* em murganhos.

Num estudo, foi administrada uma terapia génica com base em vetor viral AAV9, contendo o cDNA do gene SMN, em fetos de murganho *in utero*. (181) Utilizaram-se dois tipos de vetores, sendo que um grupo de tratamento recebeu uma injeção intracerebroventricular (ICV) de um vetor AAV9-SMN *single-stranded* (ss) e o outro grupo, uma injeção ICV de um vetor AAV9-SMN *self-complementary* (sc). (Figura 6.2.) Por conseguinte, observou-se uma taxa de sobrevivência dos murganhos tratados em ambos os grupos de estudo, significativamente maior do que a dos murganhos não tratados, sendo que o grupo scAAV9-SMN apresentou uma taxa de sobrevivência maior comparativamente ao grupo que recebeu ssAAV9-SMN. (181) O que deriva da transmissão deste vírus, ssAAV, às células hospedeiras para sintetizar DNA de cadeia dupla a partir do ssDNA, sendo que esta etapa difere consoante o tipo de célula. Para além disto, o dsDNA do scAAV apresenta uma maior estabilidade, em relação ao ssDNA do ssAAV, resultando numa expressão génica por um período mais longo. (182,183)

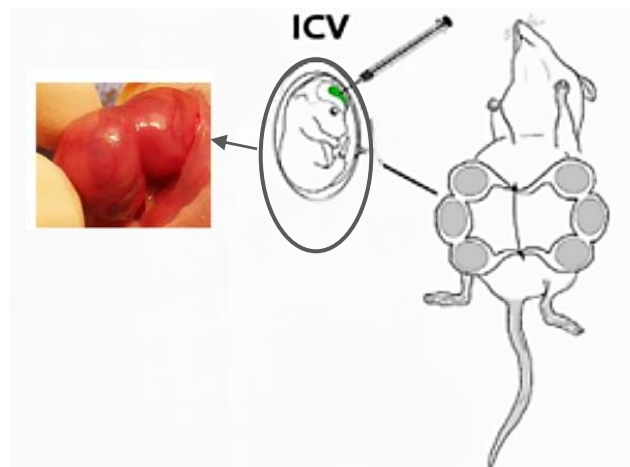


Figura 6.2. - Representação da administração da terapia génica *in utero* via intracerebroventricular (ICV). Adaptado de (181)

Adicionalmente, as manifestações musculares e o número de neurónios motores também melhoraram em ambos os grupos de estudo, com resultados ligeiramente superiores no tratamento com scAAV (Figura 6.3.) No entanto, todos os murganhos

tratados apresentaram um menor tamanho quando comparados com os murganços *wild-type*. (181)

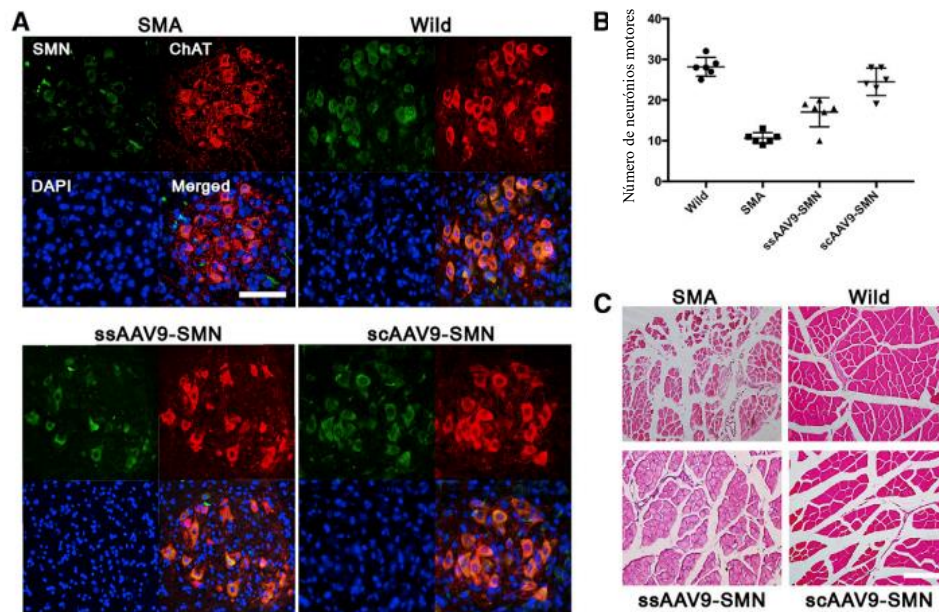


Figura 6.3. - Tratamento pré-natal de fetos de murganço SMA com rAAV9-SMN resgatou a perda de neurónios motores e preveniu a atrofia muscular ao dia pós-natal 14 (P14). (A) Estão representados neurónios motores no corno anterior da medula espinal. Murganços SMA não tratados demonstraram um sinal SMN menor nos neurónios motores em comparação com os murganços *wild-type* e grupos tratados. (B) O número de neurónios motores na medula espinal de ambos os grupos tratados com ssAAV-SMN1 e scAAV9-SMN foi significativamente maior do que no grupo SMA não tratado ( $18 \pm 2,8$  e  $24,5 \pm 3,4$  em comparação com  $10,5 \pm 1,4$ , respetivamente). Além disso, não houve uma diferença significativa entre o número de neurónios motores em murganços tratados com scAAV9-SMN e murganços *wild-type* ( $24,5 \pm 3,4$  e  $28 \pm 2,3$ , respetivamente). (C) Recorte histológico do músculo gastrocnémio, em cada grupo. Murganços SMA não tratados demonstraram músculos totalmente atrofiados, apresentando fibras musculares minúsculas, dispersas e redondas. A integridade muscular em ambos os grupos de tratamento foi resgatada, sendo que as fibras musculares do grupo scAAV9-SMN apresentam um fenótipo mais próximo dos murganços *wild-type*. Os dados apresentados indicam média  $\pm$  desvio padrão. Adaptado de (181)

Num outro estudo, em murganços, foi administrado um análogo do Risdiplam via intraperitoneal às progenitoras (com exposição dos fetos), observando-se uma melhoria nos resultados da doença, em comparação com murganços com SMA que iniciaram o tratamento pós-natal. (184)

Ambos os estudos realizados demonstram, assim, a potencialidade da terapia génica *in utero*, em aliviar os sintomas associados à SMA, bem como em aumentar a

sobrevivência. Contudo, são necessários mais estudos, nomeadamente em modelos de animais de grande porte, de modo a determinar as vias de administração mais adequadas, bem como determinar a segurança para a progenitora e feto. (7)

## **6.2. Doenças Lisossomais de Sobrecarga**

As doenças lisossomais de sobrecarga (LSDs, do inglês *lysosomal storage diseases*) constituem um grupo de doenças metabólicas hereditárias progressivas que podem ser causadas por deficiências numa determinada enzima, proteína ativadora ou transportador, o que resulta num acúmulo de metabolitos tóxicos nos lisossomas. Incluem-se neste grupo, a Doença de Gaucher, a Doença de Fabry, a Doença de Pompe, as Mucopolissacaridoses, a Doença de Niemann-Pick, entre outras. Dependendo da patologia em questão, um ou vários órgãos podem ser afetados. Uma vez que estas doenças podem afetar o cérebro, a administração de uma terapia génica antes de danos irreversíveis neurológicos seria benéfica. Para além disto, a reposição da enzima ausente em determinada patologia, no período pós-natal, pode resultar em reações imunológicas, enquanto uma abordagem *in utero* permitiria induzir tolerância à enzima e, assim, melhorar a eficácia da terapia. Adicionalmente, é importante referir que algumas das LSDs, devido ao desenvolvimento de hidrósia fetal não imune, resultam em morte *in utero* ou no período neonatal. Tal poderia ser tratado ou prevenido através da administração de uma terapia génica pré-natal. Estudos pré-clínicos de terapia génica no feto, têm-se focado nas mucopolissacaridose tipo I e tipo VII, e na doença neuropática de Gaucher. (6,7,185)

### **6.2.1. Mucopolissacaridoses**

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças LSDs genéticas raras, que resultam da falta ou deficiência de enzimas envolvidas na degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). Estes são polissacarídeos longos e não ramificados envolvidos em processos como a adesão celular e sinalização celular. Ao não serem degradados, vão acumular-se nos lisossomas, originando disfunções nas células, tecidos e órgãos. Existem sete tipos de MPS, sendo que a sua classificação vai depender da

enzima lisossomal que se encontra em falta ou em deficiência. Estes distúrbios são herdados de forma autossômica recessiva, à exceção da MPS tipo II, doença que se encontra ligada ao cromossoma X. (185-187)

A mucopolissacaridose tipo I (MPS IH, síndrome de Hurler), resulta de uma mutação no gene da  $\alpha$ -L iduronidase (IDUA), sendo a mais predominante G→A (W402X), o que leva à deficiência da enzima IDUA. Esta enzima é responsável pela degradação do sulfato de dermatano e sulfato de heparano (GAGs). Logo uma deficiência na mesma vai levar ao acúmulo destes glicosaminoglicanos não degradados e, conseqüentemente, a manifestações clínicas em múltiplos órgãos. A MPS do tipo I apresenta uma prevalência de 1/100.000 nados-vivos, sendo que a síndrome de Hurler, forma mais grave e de início precoce da doença, representa cerca de 60% dos casos e as restantes síndromes, de Hurler-Scheie e de Scheie, contabilizam 20% dos casos cada. A doença inicia-se antes do nascimento, afetando múltiplos órgãos, sendo que aos 6 meses de idade, os bebés apresentam hepatoesplenomegalia, anormalidades musculoesqueléticas, hérnias na parede abdominal, degeneração da retina, degeneração neurocognitiva e doença cardíaca. Muitas crianças morrem por volta dos 10 anos de idade, como resultado de complicações cardiorrespiratórias. Atualmente, as opções de tratamento, incluem a terapia de reposição enzimática (ERT, do inglês *enzyme replacement therapy*) e o transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT, do inglês *hematopoietic stem cell transplantation*), contudo estas demonstram limitações e capacidade limitada em corrigir o fenótipo global da doença. Assim, o diagnóstico e tratamento precoce da MPS-IH, mesmo antes do nascimento, seria vantajoso, uma vez que esta é uma patologia progressiva e começa antes do nascimento. Através da terapia ou edição génica, poderia ser possível aumentar a expressão de IDUA em órgãos específicos ou aumentando a secreção hepática de IDUA para absorção sistémica. (7,188-190)

Neste âmbito, foram realizados estudos pré-clínicos *in utero*, como por exemplo, o que se encontra seguidamente mencionado. Neste estudo, recorreu-se a um vetor viral AAV9 como sistema de entrega do editor de base de adenina, que tinha como alvo a mutação *Idua* G→A (W392X) no murganho com MPS-IH. Esta mutação resulta num fenótipo semelhante ao encontrado em humanos com MPS-IH. Neste, observou-se uma correção eficaz da mutação causadora da doença (W392X) em hepatócitos e cardiomiócitos, a longo prazo, no entanto, ocorreu uma edição de baixo nível no cérebro.

(Figura 6.4.) Assistiu-se a uma maior sobrevivência, bem como melhoria das manifestações metabólicas, musculoesqueléticas e cardíacas, devido à redução de glicosaminoglicanos. Além disso, em murganhos tratados no período pós-natal foram observados anticorpos anti-SpCas9, ao contrário daqueles tratados *in utero*. Este estudo demonstrou a eficácia e a potencialidade da estratégia de edição de bases baseada em tecnologia CRISPR na terapêutica da MPS IH, antes do nascimento, utilizando um mecanismo de entrega clinicamente relevante. Este estudo fornece assim, esperança para doenças genéticas com tratamentos pós-natais limitados. É importante referir que neste estudo, os níveis aumentados de edição observados em murganhos tratados no período pré-natal foram alcançados usando apenas 5% do volume do vetor viral entregue em adultos. Isto vem demonstrar uma das vantagens de realizar a terapia génica no período pré-natal, dado o pequeno tamanho do feto, é possível ultrapassar os desafios económicos e de engenharia relacionados com a dosagem da terapia genética no pós-natal. No entanto, como já referido anteriormente, a segurança do feto e da mãe é de extrema importância nestes procedimentos, a fim de uma possível tradução para a prática clínica. Os principais riscos incluem a mortalidade associada ao procedimento, toxicidade vetorial e mutagénesse não intencional. Contudo, apesar do presente estudo se ter demonstrado eficaz, os autores do mesmo sublinham a importância de caracterizar a relação dose-toxicidade do vetor AAV *in utero* em estudos pré-clínicos, em animais de grande porte, antes da passagem para a prática clínica, uma vez que esta ainda não foi completamente avaliada. No entanto, dada a imaturidade do sistema imunitário fetal, é concebível que a dose máxima tolerada possa ser diferente da observada em estudos pós-natais. (190)

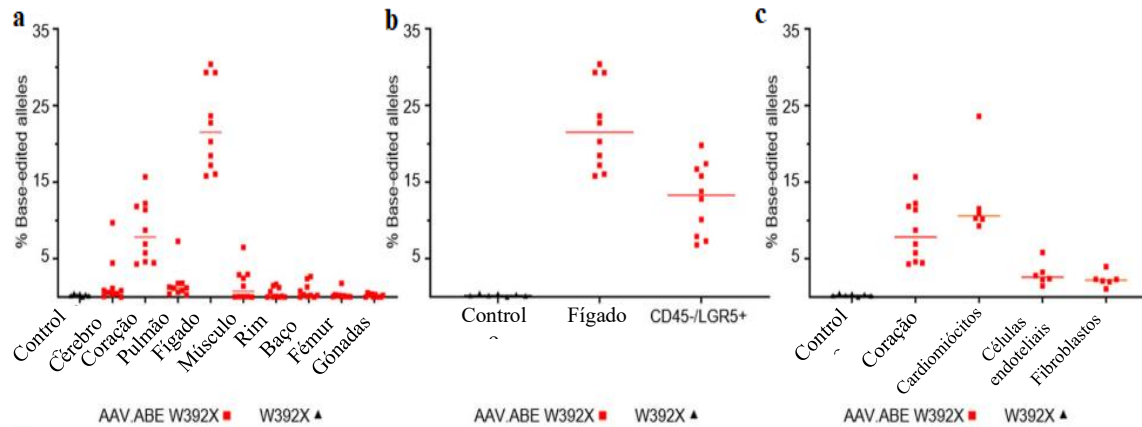


Figura 6.4. - Resultados da edição de bases *in utero* nos murganhos *Idua-W392X MPS-IH*, aos 6 meses de idade. (a) Edição nos diferentes órgãos aos 6 meses de idade. (b) Edição ao nível do fígado e células hepáticas CD45-/LGR5+ aos 6 meses de idade. (c) Edição ao nível do coração, cardiomiócitos, células endoteliais e fibroblastos aos 6 meses de idade. O controlo representa os murganhos *Idua-W392X*, que não receberam tratamento. Adaptado de (190)

Para além da MPS I, dentro do grupo das mucopolissacaridoses, há outros tipos de doenças que podem ser consideradas candidatas à terapia génica pré-natal, como é o caso da MPS VII. No caso da mucopolissacaridose tipo VII (também denominada como Doença de Sly), ocorre uma mutação no gene *GUSB*, que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase, levando a uma deficiência da atividade desta, o que vai resultar numa acumulação de GAGs (sulfato de dermatano, sulfato de heparano, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato) nos lisossomas. Estes doentes caracterizam-se por apresentarem hepatoesplenomegalia, atraso no crescimento, anormalidades esqueléticas, entre outros, sendo que a apresentação clínica mais comum é a hidrósia fetal. É uma doença que tem início *in utero* e, embora rara, tem sido uma patologia de escolha para estudar a terapia génica devido à disponibilidade de modelos animais. (9,191) Num estudo realizado em fetos de murganhos com esta patologia, foi administrada uma terapia génica à base do vetor AAV1 no ventrículo cerebral, o que resultou numa transdução generalizada e expressão de longo prazo no SNC. Isto traduziu-se em níveis terapêuticos da enzima, o que impediu o desenvolvimento de lesões no SNC e por conseguinte, possibilitou um aumento na sobrevivência dos murganhos tratados. Uma pequena quantidade de enzima, mas nenhum vetor, foi detetada fora do SNC, contudo não ocorreram efeitos adversos associados. (192)

### 6.2.2. Doença de Gaucher

A doença de Gaucher constitui uma LSD autossômica recessiva causada por mutações no gene GBA que codifica a enzima glucocerebrosidase (GCCase). Esta enzima está envolvida na degradação de glucosilceramida em ceramida. Um defeito nesta, leva à acumulação de glucosilceramida nos lisossomas de várias células, o que pode resultar, por exemplo, em deficiências ósseas e neuronais, defeitos hematológicos e hepatoesplenomegalia. (193) A doença de Gaucher pode ser classificada em três tipos, dependendo da idade de início, das manifestações clínicas e grau de envolvimento dos órgãos. A Doença de Gaucher tipo 1 (forma não neuropática) é a forma mais comum, podendo surgir na infância ou na idade adulta. Não apresenta envolvimento do SNC. A Doença de Gaucher tipo 2 (forma neuropática aguda) constitui a forma mais rara, de início precoce e progressão rápida, resultando em mortalidade antes dos 2 anos de idade. As crianças afetadas podem apresentar danos cerebrais extensos, convulsões, hipotonia, espasticidade, estrabismo, disfagia com dificuldades alimentares, hepatoesplenomegalia, entre outros. Alguns recém-nascidos apresentam hidrópsia fetal. Por último, a Doença de Gaucher tipo 3 (forma neuropática crônica), surge habitualmente na infância com manifestações neurológicas. Ao contrário do tipo 2, a progressão da doença é mais lenta. A forma neuropática aguda da doença de Gaucher, mostra-se como uma boa candidata à terapia gênica *in utero*, uma vez que apresenta um início precoce e uma rápida progressão, podendo ocorrer danos cerebrais irreversíveis na ausência de uma intervenção. (185,194)

Neste estudo foi utilizado um vetor viral AAV9, que anteriormente facilitou a expressão neuronal de um gene repórter, para tratar um modelo de murgancho transgênico para a doença de Gaucher, no qual a neurodegeneração se não tratada, resulta em morte em 2 semanas. A administração intracraniana do vetor viral AAV que codificava para a glucocerebrosidase reconstituiu a expressão neuronal da enzima, melhorando a inflamação neuronal, bem como a sobrevivência dos murganchos, até pelo menos 18 semanas. A mesma terapia quando administrada em murganchos neonatais, por via intracraniana, também resultou numa melhoria na sobrevida, mas em menor grau, destacando, assim, o benefício da terapia no período pré-natal. Em murganchos neonatais que receberam uma injeção intravenosa assistiu-se também, a uma melhoria das manifestações neurológicas, o que sugere que o vetor consegue atravessar a BHE nesta idade. Contudo, neste estudo não testaram se uma administração intravenosa no feto também conseguiria atravessar a BHE, no entanto, como a administração intravenosa

neonatal foi bem-sucedida, uma injeção sistémica *in utero* também poderá melhorar as manifestações neurológicas da doença. Os investigadores deste estudo também administraram um vetor AAV9-GFP em dois fetos de primatas não humanos saudáveis, a meio da gestação, o que resultou numa ampla distribuição em ambos os hemisférios cerebrais no nascimento. Com este estudo, conseguiu-se assim, demonstrar a capacidade da realização da terapia génica fetal no tratamento de doenças neurodegenerativas hereditárias com início precoce. A entrega da terapia a um SNC em desenvolvimento, pode-se demonstrar particularmente importante, uma vez que os neurónios apresentam capacidade regenerativa limitada, o que pode ser evidenciado pelo facto de a entrega da terapia após o nascimento se mostrar menos eficaz do que a intervenção pré-natal na prevenção da perda neuronal. (37)

### 6.3. Hemofilia

A hemofilia constitui uma doença hemorrágica congénita rara, ligada ao cromossoma X, e, portanto, afeta quase exclusivamente indivíduos do sexo masculino. Ocorre devido a mutações no gene do fator VIII, no caso da Hemofilia A, ou no gene do fator IX, resultando em Hemofilia B. Estas mutações vão levar à deficiência dos fatores de coagulação anteriormente mencionados, o que leva a equimoses fáceis e hemorragias frequentes, especialmente a nível articular e muscular. A hemofilia A (80%-85% dos casos) ocorre mais frequentemente que a hemofilia B (15% a 20% dos casos), sendo que a primeira apresenta uma prevalência ao nascer de 24,6 casos por 100.000 homens para a hemofilia A (9,5 casos para hemofilia A grave) e 5,0 casos por 100.000 homens para a hemofilia B (1,5 casos para hemofilia B grave). (195,196)

O tratamento destas condições envolve terapia de reposição com o fator VIII humano (hFVIII) ou o hFIX. Este tipo de tratamento demonstra-se eficaz, permitindo aumentar a esperança média de vida destes indivíduos, contudo, alguns doentes desenvolvem anticorpos contra os fatores VIII e IX transfundidos, resultando em ineficácia. (197) Atualmente, para o tratamento da Hemofilia A e B em adultos, já se encontram aprovados pela EMA medicamentos à base de terapia génica. O Roctavian (*Valoctocogene roxaparvovec*) utilizado no tratamento hemofilia A grave, em adultos que não possuam anticorpos contra o fator VIII, nem contra o vírus AAV5. (198) Já o Hemgenix

(*etranacogene dezaparvovec*) está indicado no tratamento da hemofilia B moderadamente severa ou severa, em adultos que não desenvolveram anticorpos contra o fator IX. (199)

Contudo, como já descrito anteriormente, existem várias vantagens na realização de uma terapia gênica pré-natal em comparação com uma terapia pós-natal, sendo que esta iria permitir ultrapassar a limitação anterior, devido ao facto de ser possível desenvolver tolerância ao transgene e, deste modo, readministrar a terapêutica, se tal for necessário. Assim, têm sido realizados vários estudos pré-clínicos em modelos animais para a Hemofilia A e B, mostrando-se tanto a entrega através de sistemas virais como através de células promissora. Relativamente à hemofilia A, foi recentemente realizado um estudo em fetos ovinos com 60-64 dias de gestação, o que corresponde a 16-18 semanas de gestação em humanos, onde se realizou um transplante *in utero* de células da placenta humana transduzidas com vetor LV que codificava para um transgene de alta expressão de FVIII, mcoET3. Este procedimento apresentou risco mínimo tanto para o feto quanto para a progenitora. O transplante pré-natal resultou em níveis plasmáticos terapêuticos e sustentados de FVIII por pelo menos 3 anos após o tratamento, apesar do rápido crescimento dos animais (que tinham cerca de 0,1kg no momento do transplante e, ao fim dos três anos, apresentavam um peso cerca de 80 kg). Para além disto, verificou-se também que não ocorreu qualquer toxicidade hepática, nem resposta celular ou humoral às células transduzidas ou ao transgene mcoET3, bem como qualquer toxicidade derivada do vetor. Este estudo vem comprovar a vantagem imunológica desta terapêutica, bem como segurança no tratamento da hemofilia A antes do nascimento. (200)

Relativamente à hemofilia B, num estudo em murganhos com défice do fator IX, verificou-se que a administração *in utero* de uma terapia AAV-1-hFIX e, posterior readministração da mesma no período pós-natal, resultava numa expressão a longo prazo do hFIX, não se tendo verificado resposta celular ou imune contra este, ao contrário dos murganhos adultos que desenvolveram anticorpos para o hFIX assim, como contra a cápside viral. (201) Para além de estudos em murganhos, foram também desenvolvidos estudos em fetos ovinos com recurso a vetor AAV, contudo, apesar de no início os níveis de hFIX aumentarem, à medida que os pesos do fígado e dos animais aumentaram, também os níveis de hFIX diminuíram, tendo sido detetados, após 6 meses da administração da terapia, níveis baixos do fator. (202) Também foram realizados estudos pré-clínicos em primatas não humanos, *Macaca fascicularis*, tendo sido administradas por via intravenosa no final da gestação (0.9G, equivalente a 135–141 dias), uma terapia

génica com base num vetor scAAV5 e outra utilizando um vetor sc-AAV8, ambos contendo o transgene do hFIX dirigido pelo promotor LP1 (do inglês, *liver-specific promoter 1*). Isto resultou em níveis sustentados e clinicamente relevantes de hFIX com expressão específica do fígado, tendo-se verificado uma maior expressão do fator com AAV8-hFIX. (203) Quatro dos seis animais que receberam a terapia génica continuaram a demonstrar níveis terapêuticos sustentados de hFIX durante os 6 anos de monitorização. Os dois animais que exibiram baixa expressão transgénica prolongada foram submetidos a uma readministração da terapia, tendo-se verificado uma breve reação imunitária, mas sem qualquer toxicidade. No entanto, a expressão de hFIX não melhorou com a dose administrada. (Figura 6.5.) Este estudo, veio assim, demonstrar a segurança e eficácia da administração de AAV-hFIX no final da gestação, bem como o facto de ser possível realizar uma readministração no período pós-natal sem uma forte reação imune, não sendo necessária imunossupressão, no entanto, de modo a alcançar a expressão terapêutica desejada, será necessária uma otimização da dose. Adicionalmente, para averiguar uma eventual genotoxicidade do vetor ou uma possível transmissão para a linha germinativa, é necessária uma monitorização ao longo da vida. (204)

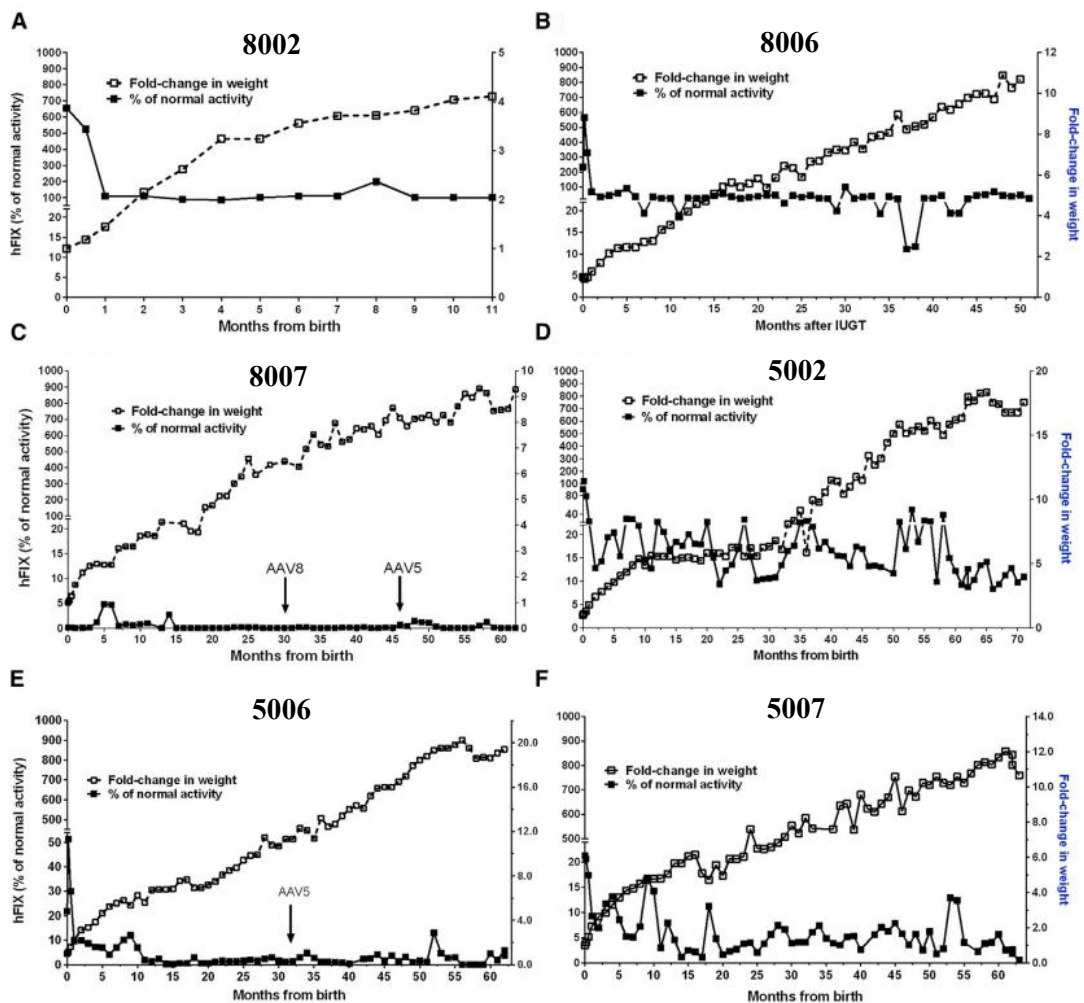


Figura 6.5. – Níveis de expressão de hFIX em modelos animais tratados com AAV8-hFIX ou AAV5-hFIX, no final da gestação (0.9G). Ao longo de 11 a 71 meses, a expressão do hFIX manteve-se em  $31,6 \pm 58,8\%$  (AAV8) e  $10,8 \pm 9,2\%$  (AAV5). 5006 e 8007 exibiram expressão subterapêutica ( $<1\%$ ), tendo sido submetidos a uma readministração da terapia no período pós-natal (setas). Níveis terapêuticos de hFIX encontram-se entre 3.9% - 120.0%. Adaptado de (204)

Num outro estudo, realizado em fetos da mesma espécie de primatas que o estudo anterior, foram administradas, a um tempo de gestação mais precoce (0.4G), terapias gênicas baseadas em AAV5-hFIX ou AAV8-hFIX, ambos contendo o promotor LP1. Verificou-se que os animais que receberam AAV5-hFIX demonstraram uma expressão de hFIX a longo prazo, significativamente menor que os animais que receberam AAV8-hFIX. (Figura 6.6.) Ao longo de 4 anos de monitorização não foi observado qualquer efeito adverso devido a toxicidade ou integração do vetor AAV. Apesar das hemofilias não serem doenças que exijam uma intervenção *in utero*, do ponto de vista de início da doença, os resultados dos últimos dois estudos são encorajadores, pois demonstraram que

a realização de uma terapia génica pré-natal com recurso a vetores AAV5 e AAV8 e tendo como alvo o fígado, é possível num período mais precoce da gestação ou mesmo no final desta, com eficácia e seguranças razoáveis. (112)

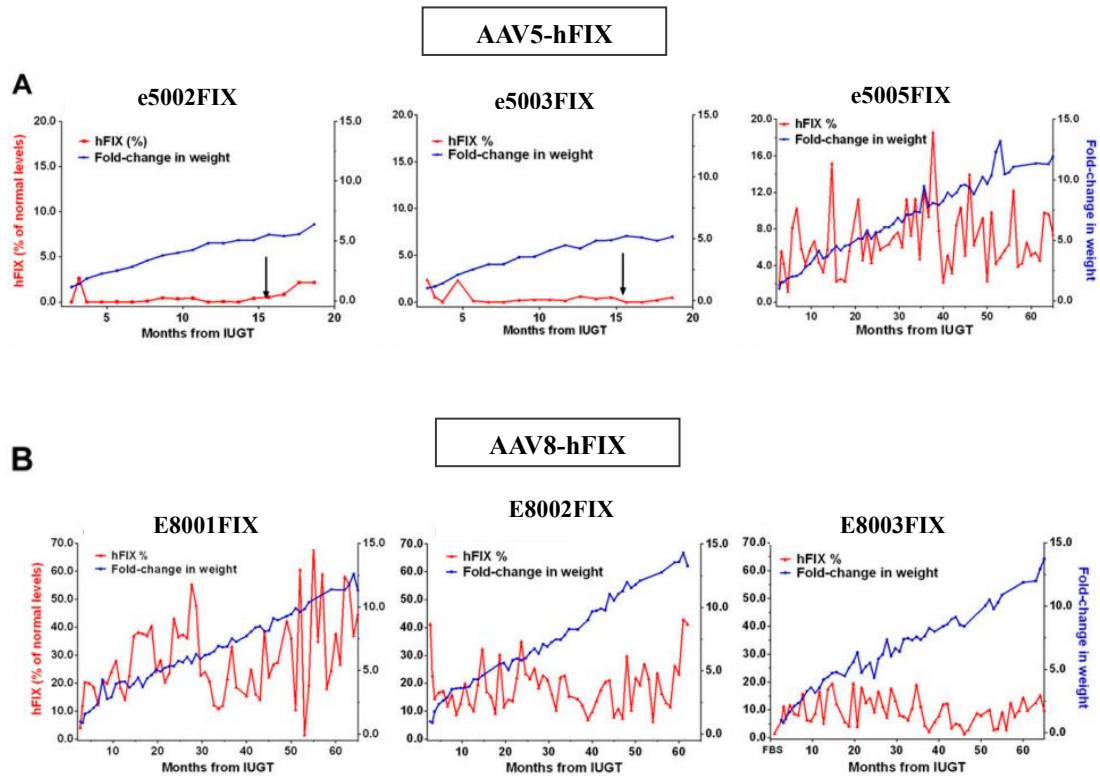


Figura 6.6. – Níveis de expressão de hFIX em modelos animais tratados com AAV5-hFIX ou AAV8-hFIX. (A) Os animais tratados com AAV5-hFIX foram e5002FIX e 5003FIX, ambos apresentam níveis subterapêuticos, e e5005FIX que demonstrou níveis terapêuticos. (B) Os modelos animais que receberam AAV8-hFIX foram e8001FIX, e8002FIX e e8003FIX que demonstraram uma expressão sustentada, apesar do rápido crescimento. Adaptado de (112)

Com isto, pode-se concluir que a terapia génica pré-natal apresenta o potencial de tratar precocemente a hemofilia A e B, mudando o paradigma de tratamento atual, sem resultar numa resposta do sistema imunitário à cápside viral ou às células que entregam o transgene, bem como impedir o desenvolvimento de anticorpos contra FVIII ou FIX. (7)

## 6.4. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem as doenças monogénicas hereditárias mais comuns em todo o mundo. Estima-se que, anualmente, mais de 330.000 crianças nasçam com estes distúrbios, sendo que destes, 83% apresentam anemia falciforme e 17% síndromes talassémicas. Além disso, crê-se que estas patologias sejam responsáveis por cerca de 3,4% das mortes em crianças com menos de 5 anos de idade. As hemoglobinopatias podem resultar de deleções ou mutações pontuais nos genes da  $\alpha$  ou  $\beta$ -globina, o que pode levar a alterações na síntese ou na estrutura da hemoglobina, resultando em síndromes talassémicas ou em variantes estruturais da hemoglobina, respetivamente. Estas doenças são mais prevalentes na área do Mediterrâneo, Médio Oriente, Ásia e costa norte de África, mas devido à migração, estas doenças têm aumentado em países do norte da Europa e da América, tornando-se este num problema de saúde pública. (205,206)

A  $\alpha$ -talassemia major, se não tratada, é geralmente fatal antes do nascimento. As transfusões intrauterinas vieram permitir a sobrevivência destes fetos até ao seu nascimento, contudo, estes vão precisar de transfusões crónicas ao longo da vida. Deste modo, esta torna-se numa doença candidata para terapia génica pré-natal. (207) Doentes com  $\beta$ -talassemia major ou intermédia, são submetidos a transfusões sanguíneas e terapia de quelação de ferro ao longo da vida. Para a anemia falciforme, o tratamento muitas vezes disponível tem como objetivo evitar as crises dolorosas e aliviar a sintomatologia associada à doença, sendo este um tratamento crónico. Embora o transplante de células estaminais hematopoiéticas e, mais recentemente, a terapia génica utilizando vetores lentivirais, no período pós-natal, surjam como terapias curativas, a falta de doadores adequados no primeiro caso e o alto custo de tratamento do segundo, impedem muitas vezes a realização destes tratamentos. (208,209)

Assim uma terapêutica génica ainda antes do nascimento, podia-se mostrar mais vantajosa, nomeadamente, pelo facto de ser possível o acesso às células estaminais hematopoiéticas no fígado fetal, antes das mesmas migrarem para a medula óssea. (7) Como exemplo disto, destaca-se um estudo pré-clínico, já abordado no ponto 5.3.3.1., em fetos de murganhos com  $\beta$ -talassémia, onde a administração via intravenosa de nanopartículas poliméricas, contendo ácidos nucleicos peptídicos e DNA doador, resultou numa acumulação mais pronunciada das mesmas no fígado fetal, local da hematopoiese

fetal, com uma entrega bem-sucedida às HSCs. Estes resultados tornam-se encorajadores no tratamento de outras hemoglobinopatias *in utero*. (76)

## 6.5. Doenças Pulmonares Monogénicas

As doenças pulmonares monogénicas constituem um fator significativo de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com limitadas opções terapêuticas. Dentre estas, destacam-se a fibrose cística, síndromes de disfunção da proteína surfactante e deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina. Os avanços na medicina fetal e no diagnóstico pré-natal que têm ocorrido, possibilitam diagnosticar cada vez mais estas doenças antes do nascimento. Isto, combinado com o facto de que muitas vezes a patologia surge *in utero*, e resulta em morbidade e/ou mortalidade perinatal, ou mesmo em doença pulmonar crónica, torna-se num argumento para a intervenção antes do nascimento. Para além disto, a transição da vida intra-uterina para a vida pós-natal, destaca tal benefício no tratamento de variadas doenças pulmonares monogénicas, uma vez que aquando do nascimento é necessária uma função pulmonar adequada para a sobrevivência do bebé. Na verdade, estudos pré-clínicos realizados no período pré-natal para a fibrose cística e deficiência congénita da proteína surfactante, têm demonstrado sucesso terapêutico. Os recentes progressos na tecnologia de edição de genes, destacam para o potencial desta estratégia no período pré-natal para o tratamento de doenças pulmonares congénitas. (7,210)

### 6.5.1. Fibrose Cística

A fibrose cística é uma doença autossómica recessiva que afeta pelo menos 100.000 indivíduos em todo o mundo. (211) Esta patologia resulta de mutações no gene regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR, do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que se encontra no cromossoma 7q31.2. Alterações neste gene, vão levar à deficiência qualitativa e/ou quantitativa da proteína CFTR, o que se vai traduzir num transporte anormal de iões nas membranas mucosas de todo o corpo, levando à formação de muco espesso, desidratado e com pH desequilibrado, e, conseqüentemente a um comprometimento dos sistemas respiratório, gastrointestinal, metabólico e reprodutivo. (212,213) A mutação que ocorre mais frequentemente nesta patologia é denominada F508del, uma deleção de três pares de bases no cromossoma 7,

resultando na perda de um resíduo de fenilalanina, o que vai levar a uma maior degradação da proteína CFTR antes que esta possa atingir a superfície celular. (214) Esta doença genética já foi considerada durante muito tempo, como uma doença hereditária fatal na infância, mas devido a melhorias nos cuidados de saúde e ao acesso de terapias modeladoras da proteína CFTR, o prognóstico destes doentes tem melhorado. Tal que, atualmente, existem, em muitas regiões, mais adultos do que crianças com fibrose cística. Apesar disto, esta continua a estar associada a uma redução da esperança de vida, a uma baixa qualidade de vida e de tratamentos, devido às manifestações clínicas associadas. (215)

A fibrose cística é uma doença que começa *in utero*, observando-se várias manifestações em recém-nascidos, tais como sistema reprodutor masculino prejudicado, desenvolvimento gastrointestinal anormal, o que leva ao íleo meconial, ou insuficiência pancreática exócrina. (7) Administrar uma terapia génica, no entanto, em indivíduos com fibrose cística, tendo como alvo o pulmão torna-se um desafio, uma vez que, mesmo em crianças, as vias aéreas apresentam muco viscoso, inflamação e tecido cicatrizado, bem como devido à disfunção do sistema imunológico. Tendo isto em conta, será mais fácil corrigir a fibrose cística durante o desenvolvimento fetal, período no qual, o líquido amniótico entra e sai livremente dos pulmões. Assim, uma forma eficiente de entrega da terapia às vias aéreas seria através de uma administração intra-amniótica. (24)

Embora os estudos pré-clínicos até agora realizados, em murganhos, de terapia génica com recurso a vetores virais como adenovírus e lentivírus, tenham demonstrado pouco sucesso *in utero*, crê-se que a aplicação de estratégias de edição génica, nomeadamente, as que tenham demonstrado resultados promissores na terapia génica pós-natal, possam ser adaptadas a uma aplicação *in utero*, o que traria mais vantagens do que o esperado em adultos. Sendo que uma administração intra-amniótica da terapia iria resultar numa distribuição da mesma para o pulmão e intestino fetal, sendo assim útil, na correção genética de doenças que afetem o pulmão ou o intestino, como a fibrose cística. (3,76) Contudo, para que tal seja concretizado, torna-se importante que diagnósticos pré-natais sejam realizados, nomeadamente, quando existe um risco acrescido de o bebé desenvolver fibrose cística, ou por história familiar ou por os pais serem portadores de um gene alterado, de forma a se realizar uma intervenção precoce. Este, normalmente, poderá ser feito através da colheita de células de vilosidades coriônicas ou do líquido amniótico, nas primeiras semanas de gravidez. (216) Outro fator a ter em conta é que

existem várias mutações genéticas que causam esta patologia, logo o seu tratamento ou cura não será único. Neste caso, a terapia génica deverá ser individualizada, de modo a atender às necessidades dos doentes com fibrose cística. (217)

#### 6.5.2. Síndromes de disfunção da proteína surfactante

O surfactante pulmonar, sintetizado em células epiteliais alveolares tipo 2 (AEC2s, do inglês *Alveolar Epithelial Type 2 Cells*) e secretado nos alvéolos a partir da 24<sup>a</sup> semana de gestação, é constituído por uma mistura complexa de lípidos e proteínas. A componente lipídica representa 90% do surfactante pulmonar, e é essencial na redução da tensão superficial na interface ar-líquido alveolar, prevenindo o colapso alveolar no final da expiração. O restante é constituído pelas quatro proteínas surfactantes (SP-A, SP-B, SP-C e SP-D), e por outras proteínas adicionais, o transportador transmembranar ABCA3 (*adenosine triphosphate binding cassette protein member 3*) e TTF1 (*thyroid transcription factor-1*), necessárias à estrutura e normal funcionamento do surfactante pulmonar. As SP-B e SP-C são proteínas hidrofóbicas envolvidas na redução da tensão superficial, enquanto as proteínas surfactantes hidrofílicas, SP-A e SP-D, desempenham papéis importantes na imunidade inata. (218,219)

A síndrome de dificuldade respiratória (SDR) por défice de surfactante, costuma ser frequente em recém-nascidos pré-termo. Contudo, em recém-nascidos pré-termo tardios ou a termo, a SDR grave sugere uma etiologia genética subjacente. Alterações nos genes que codificam as proteínas surfactantes, genes SFTPB e SFTPC, e no gene que codifica para o ABCA3 podem resultar numa síntese insuficiente de surfactante, na interrupção do metabolismo deste ou em lesão secundária nas AEC2s. Consequentemente, estas alterações podem levar ao desenvolvimento da SDR grave em neonatais ou em doença pulmonar intersticial infantil. Uma deficiência na proteína surfactante B está associada à SDR grave no período neonatal, sendo necessário um transplante pulmonar para o bebé sobreviver. Alterações no gene SFTPC são herdadas de forma autossómica dominante, resultando mais frequentemente em doença pulmonar intersticial infantil ou fibrose pulmonar idiopática. Já as alterações no gene que codifica para o transportador ABCA3, levando à deficiência deste, frequentemente resultam em SDR neonatal ou doença pulmonar intersticial infantil. (219,220)

Deste modo, torna-se importante o desenvolvimento de terapêuticas que permitam intervir precocemente no tratamento destas patologias pulmonares, nomeadamente *in utero*, uma vez que estas ao apresentarem uma elevada mortalidade neonatal, excluem uma possível abordagem pós-natal. Deste modo, têm sido realizados estudos pré-clínicos no âmbito da terapia génica *in utero*, tendo já sido abordado no ponto 5.3.3.1., um estudo onde a aplicabilidade da edição de genes *in utero*, através da tecnologia CRISPR-Cas9, foi demonstrada ao melhorar o fenótipo de uma doença pulmonar monogénica, resultante de uma mutação  $Sftpc^{I73T}$ , bem como ao aumentar a sobrevivência dos murganhos tratados. (173)

## 7. Considerações de Segurança

Apesar desta constituir uma terapêutica promissora no tratamento de várias doenças genéticas passíveis de diagnóstico pré-natal, aquando do desenvolvimento do feto, também é importante considerar os riscos inerentes de tal intervenção. Tais riscos podem ser divididos em aqueles associados à intervenção fetal, ou os relativos à terapia génica.

Assim como acontece em qualquer intervenção fetal, além de ser importante assegurar que esta é segura para o feto, também a segurança da progenitora deve ser considerada. Apesar de ser possível ocorrerem infeções, parto prematuro ou aborto, existe uma quantidade significativa de dados clínicos que comprovam ser possível aceder ao feto múltiplas vezes com um risco consideravelmente reduzido associado ao procedimento. (36) Sendo que, no caso de uma administração sistémica ao feto, os riscos são comparáveis aos de uma transfusão sanguínea através da veia umbilical. Este último é um procedimento realizado com recurso a ultrassom, e apresenta uma taxa de complicações maternas/fetais de 1,2% e uma taxa de perda fetal de 0,6%. (49,221) Para além disto, no caso de ocorrer uma exposição da progenitora à terapia administrada ao feto, é importante considerar uma possível resposta imunológica materna à proteína da cápside viral e/ou à proteína recombinante. Contudo, este último caso torna-se improvável, tendo em conta que a progenitora já deveria estar a produzir a proteína que se encontra em falta no feto, e, portanto, ser tolerante a esta. Assim, num primeiro ensaio é possível que sejam excluídas as progenitoras com anticorpos pré-existentes ao vetor que pudessem atravessar a placenta. (32,38) Isto torna-se importante, uma vez que ao se analisar a exposição da progenitora ao vetor viral, num estudo de terapia génica *in utero* realizado em primatas não humanos, verificou-se que ocorreu passagem transplacentária do vetor viral, com conseqüente transdução de tecidos maternos, no entanto não foi observada imunogenicidade, nem transdução da linha germinativa. (203) Assim, protocolos clínicos deverão incluir uma monitorização da exposição materna à terapia génica, bem como de respostas imunológicas. (7)

Esta terapêutica apesar de apresentar várias vantagens, pode afetar negativamente o feto e o seu desenvolvimento normal, sendo que a técnica de administração ou qualquer toxicidade associada ao vetor devem ser avaliadas. Os riscos associados à terapia génica pré-natal incluem a possibilidade de efeitos adversos no desenvolvimento fetal,

mutagênese por inserção e transdução ou edição da linha germinativa. (36) Outra preocupação é a possibilidade de integração do vetor viral fora do alvo, o que pode conduzir a mutagênese por inserção no genoma do hospedeiro e resultar, por exemplo, na ativação de oncogenes ou na inativação de genes supressores de tumor. (222) Considera-se que em resultado do ambiente fetal, ou seja, este apresentar um nível elevado de proliferação celular, uma abundância de fatores de crescimento e os genes associados à regulação do crescimento e diferenciação se encontrarem num estado transcricionalmente ativo, pode haver uma maior predisposição para o desenvolvimento de tumores após integração de vetores no genoma do hospedeiro. Mais especificamente, observou-se uma alta incidência de carcinoma hepatocelular em murganhos após administração *in utero* com um vetor do vírus da anemia infecciosa equina, mas não se observou o mesmo com um vetor de HIV. Isto sugere que o feto possa ser sensível ao desenvolvimento de tumores por indução de certos vetores. (36,197,223) Embora a terapia génica pré-natal se destine às células somáticas existe o risco de uma possível transdução ou edição da linha germinativa. No feto humano, por volta da 7<sup>a</sup> semana de gestação ocorre a compartimentação das células germinativas primordiais nas gónadas, sendo que até isto ocorrer as células encontram-se mitoticamente ativas e desprotegidas. Deste modo, a terapia génica *in utero* deve ser realizada preferencialmente após este período, com vista a minimizar o risco de afetar a linha germinativa. (224)

Neste seguimento, surge também a questão da idade gestacional a partir da qual se pode administrar uma terapia génica ao feto em segurança. Uma vez que a tolerância imunológica fetal ocorre entre as 11 a 14 semanas de gestação, crê-se que a sua administração seja mais benéfica quando realizada perto do início deste intervalo. (225-228)

## 8. Considerações Éticas

A administração de uma terapia génica em fetos humanos levanta múltiplas questões éticas, que se traduzem numa barreira à implementação da mesma na prática clínica, principalmente pelo facto de este ser um procedimento complexo, que envolve dois indivíduos, o feto e a progenitora. Deste modo, deve ser feita uma avaliação prévia dos riscos e benefícios para ambos. Em intervenções que envolvam a edição génica de células somáticas, será necessário um acompanhamento ao longo da vida dos indivíduos que receberam a terapia, de modo a averiguar a eficácia da intervenção e, no caso de uma administração sistémica, permitir a monitorização da atividade fora do alvo. Uma das principais preocupações reside no facto desta terapia poder afetar a linha germinativa, o que pode afetar não apenas a criança que recebeu a terapêutica *in utero*, mas também as subsequentes gerações. (7)

Para que haja uma implementação desta na prática clínica, devem ser estabelecidas, previamente, a segurança e a eficácia a longo prazo, em modelos animais adequados, o que envolverá estudos toxicológicos, bem como experiências ao longo de gerações. Posteriormente, os ensaios de fase I em humanos deverão constituir dificuldades, uma vez que se irá testar a terapêutica em mulheres grávidas, onde os estudos toxicológicos são normalmente contraindicados. Quando esta aplicação em humanos se tornar possível, serão fundamentais um aconselhamento parental imparcial e o consentimento informado, devendo os progenitores ser informados acerca de todas as opções disponíveis, término da gravidez, continuação da gravidez afetada e informação relativamente aos tratamentos disponíveis no período pós-natal para a doença em questão, ou a realização de uma terapêutica experimental, expondo os riscos e benefícios inerentes a cada uma. É importante ressaltar que a segurança da progenitora é fundamental durante qualquer procedimento fetal. Uma vez que os possíveis riscos que podem advir desta terapêutica, podem englobar a progenitora, bem como o feto e, possivelmente a futura descendência, os pais serão obrigados a consentir um acompanhamento ao longo da vida relativamente aos anteriores. Contudo, o consentimento pode ser retirado a qualquer momento pelos progenitores, bem como pela criança, uma vez atingida a maioridade, o que pode levar a uma perda significativa do acompanhamento destes indivíduos e possíveis efeitos adversos. Outras questões éticas surgem do facto de mesmo após a administração de uma terapia génica fetal bem-sucedida, pode ocorrer aborto espontâneo, nado-morto, ou pode resultar no tratamento parcial de uma patologia grave e fatal, isto é,

neste caso o bebê sobreviveria, contudo, apresentaria graves problemas de saúde. Para além disto, surgem outras questões, como por exemplo, a suspensão e retirada de cuidados, no caso de recém-nascidos gravemente afetados, ou se no caso da terapêutica *in utero* não resultar, se o aborto tardio estará disponível. Felizmente, a experiência clínica que já existe com a cirurgia fetal e outras intervenções fetais vem de certa forma constituir a base para estas questões. Tudo isto deverá ser considerado antes de uma aplicação prematura desta terapêutica, de modo a evitar possíveis consequências devastadoras. (7,9,32,49)

## 9. Conclusão

A terapia génica pré-natal apresenta-se, assim, como uma estratégia promissora no tratamento de uma panóplia de doenças monogénicas graves, que tenham início durante o desenvolvimento fetal e resultem em morbilidade ou mortalidade *in utero* ou após o nascimento, como também no tratamento de condições maternas que afetem de forma negativa o feto. Esta apresenta-se vantajosa a uma possível terapia génica pós-natal e viria a fornecer uma 3ª escolha aos pais, quando estes se deparam com um diagnóstico pré-natal de uma doença genética debilitante ou para a qual não existe um tratamento efetivo no período pós-natal.

Apesar deste parecer um conceito simples em teoria, a verdade é que é uma terapêutica complexa, assim como qualquer intervenção fetal, uma vez que se deve ter em consideração 2 indivíduos, o feto e a mãe. Os riscos de tal intervenção para a progenitora e feto, bem como as questões éticas associados a esta terapêutica, parecem constituir uma barreira à sua tradução para a prática clínica, contudo, os estudos pré-clínicos desenvolvidos ao longo dos anos demonstram um claro potencial da mesma. A tecnologia de edição génica demonstra-se particularmente interessante na correção de patologias *in utero*, com uma maior segurança e eficácia, no entanto possíveis riscos devem ser investigados. Posteriormente, aquando de uma prática em humanos, será obrigatório um aconselhamento imparcial aos progenitores, com a exposição dos riscos e benefícios das diferentes opções disponibilizadas, bem como de um consentimento informado.

O ideal de que uma única administração desta terapêutica *in utero* pudesse curar uma patologia grave, nascendo um bebé saudável, torna-se bastante apelativo. Permitiria não só ao indivíduo uma boa qualidade de vida como à família, uma vez que não seria necessário um tratamento de suporte ao longo da vida, trazendo também benefícios sociais e económicos. Assim, embora esta ainda se encontre em estudos pré-clínicos, poderá no futuro se tornar numa realidade da prática clínica.



## 10. Referências Bibliográficas

1. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.
2. Angastiniotis M, Vives Corrons JL, Soteriades ES, Eleftheriou A. The impact of migrations on the health services for rare diseases in Europe: the example of haemoglobin disorders. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013:727905.
3. Mattar CNZ, Chan JKY, Choolani M. Gene modification therapies for hereditary diseases in the fetus. *Prenat Diagn*. 2023;43(5):674–86.
4. Moorthie S, Blencowe H, W. Darlison M, Lawn JE, Mastroiacovo P, Morris JK, et al. An overview of concepts and approaches used in estimating the burden of congenital disorders globally. *J Community Genet*. 2018;9(4):347–62.
5. World Health Organization. Congenital disorders [Internet]. 2023 [citado 10 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/birth-defects>
6. Yung NK, Maassel NL, Ullrich SJ, Ricciardi AS, Stitelman DH. A narrative review of in utero gene therapy: Advances, challenges, and future considerations. *Transl Pediatr*. 2021;10(5):1486–96.
7. Herzeg A, Almeida-Porada G, Charo RA, David AL, Gonzalez-Velez J, Gupta N, et al. Prenatal Somatic Cell Gene Therapies: Charting a Path Toward Clinical Applications (Proceedings of the CERSI-FDA Meeting). *J Clin Pharmacol*. 2022; 62(S1): S36–52.
8. Palanki R, Peranteau WH, Mitchell MJ. Delivery technologies for in utero gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021; 169:51–62.
9. David AL. Fetal Gene Therapy. Em: Pandya PP, Wapner R, Oepkes D, Sebire N, editores. *Fetal Medicine: Basic Science and Clinical Practice*. 3ª edição. Elsevier; 2019. p. 560-571.
10. Peranteau WH, Flake AW. The Future of In Utero Gene Therapy. *Mol Diagn Ther*. 2020;24(2):135–42.
11. Hartman HA, Rossidis AC, Peranteau WH. In Utero Gene Therapy and Genome Editing. *Curr Stem Cell Rep*. 2018;4(1):52–60.
12. Macpherson JL, Rasko JEJ. Clinical potential of gene therapy: Towards meeting the demand. *Intern Med J*. 2014;44(3):224–33.
13. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: Progress and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015;282 (1821).
14. Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(5):753–70.
15. Friedmann T. The road toward human gene therapy - A 25-year perspective. *Ann Med*. 1997;29(6):575–7.
16. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972;175(4025):949–55
17. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525(2):162–9.
18. Blaese R, Culver K, Miller A, Carter C, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270(5235):475–80.

19. Jensen TL, Gøtzsche CR, Woldbye DPD. Current and Future Prospects for Gene Therapy for Rare Genetic Diseases Affecting the Brain and Spinal Cord. *Front Mol Neurosci.*2021;14:695937.
20. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80(1–2):148– 58.
21. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Hum Gene Ther.* 2018;29(2):160–79.
22. Liang M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Curr Cancer Drug Targets.* 2018;18(2):171–6.
23. Buckley SMK, Rahim AA, Chan JKY, David AL, Peebles DM, Coutelle C, et al. Recent advances in fetal gene therapy. *Ther Deliv.* 2011;2(4):461–9.
24. DeWeerd S. Prenatal gene therapy offers the earliest possible cure. *Nature.* 2018;564(7735):S6-S8.
25. Coutelle C. An important step on the long path to clinical application of in utero gene therapy. *Gene Ther.* 2018;25(7):451–3.
26. Liley AW. Intrauterine Transfusion of Foetus in Haemolytic Disease. *Br Med J.* 1963;2(5365):1107–9.
27. Porada C, Almeida-Porada G. Fetal Gene Therapy. Em: Kang C, editor. *Gene Therapy Applications.* IntechOpen; 2011. p. 307–24.
28. Kilby MD, Oepkes D, Johnson A. The rationale for fetal therapy. Em: *Fetal Therapy: Scientific Basis and Critical Appraisal of Clinical Benefits.* Cambridge University Press; 2012. p. 1–11.
29. Phithakwatchara N, Nawapun K, Panchalee T, Viboonchart S, Mongkolchat N, Wataganara T. Current Strategy of Fetal Therapy I: Principles of In-utero Treatment, Pharmacologic Intervention, Stem Cell Transplantation and Gene Therapy. *Journal of Fetal Medicine.* 2017;4(3):131–8.
30. Fetal medicine past, present, and future. *The Lancet.* 2019;393(10173):717.
31. Touraine J, Raudrant D, Royo C, Rebaud A, Roncarolo M, Souillet G, et al. In-utero transplantation of stem cells in Bare Lymphocyte Syndrome. *The Lancet.* 1989;333(8651):1382.
32. MacKenzie T. Future AAVenues for In Utero Gene Therapy. *Cell Stem Cell.* 2018;23(3):320–1.
33. Coutelle C, Douar A, Colledge W. The challenge of fetal gene therapy. *Nat Med.* 1995;1(9):864–6.
34. Health Departments of the United Kingdom N 1998. Gene Therapy Advisory Committee. Report on the potential use of gene therapy in utero. *Hum Gene Ther.* 1999;10(4):689–92.
35. U.S. National Institutes of Health. Recombinant DNA Advisory Committee. Prenatal Gene Transfer: Scientific, Medical, and Ethical Issues: a Report of the Recombinant DNA Advisory Committee. *Hum Gene Ther.* 2000;11(8):1211–29.
36. Almeida-Porada G, Atala A, Porada CD. In utero stem cell transplantation and gene therapy: rationale, history, and recent advances toward clinical application. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 5:16020.
37. Massaro G, Mattar CNZ, Wong AMS, Sirka E, Buckley SMK, Herbert BR, et al. Fetal gene therapy for neurodegenerative disease of infants. *Nat Med.* 2018;24(9):1317–23.

38. Almeida-Porada G, Waddington SN, Chan JKY, Peranteau WH, MacKenzie T, Porada CD. In Utero Gene Therapy Consensus Statement from the IFeTIS. *Molecular Therapy*.2019;27(4):705–7.
39. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. 2001.
40. Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, et al. Gene therapy leaves a vicious cycle. *Front Oncol*.2019;9:297.
41. Del Pozo-Rodríguez A, Rodríguez-Gascón A, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Gómez-Aguado I, Battaglia LS, Solinís MÁ. Gene Therapy. Em: Silva AC, Moreira JN, Lobo, JMS, Almeida H, editores. *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Cham; 2019;171, p. 321–68.
42. Clothier C, Great Britain. Report of the Committee on the Ethics of Gene Therapy. 1992. London: Her Majesty's Stationery Office (HMSO); 1992.
43. Papanikolaou E, Bosio A. The Promise and the Hope of Gene Therapy. *Front Genome Ed*. 2021; 3:618346.
44. Lim KMX, Mahyuddin AP, Gosavi AT, Choolani M. Genetics in prenatal diagnosis. *Singapore Med J*. 2023;64(1):27-36.
45. Levy B, Bianchi DW, Van Mieghem T, Deprest J, Ghidini A, Chitty LS. In case you missed it: The Prenatal Diagnosis editors bring you the most significant advances of 2017. *Prenat Diagn*. 2018;38(2):83–90.
46. Associação Portuguesa de Diagnóstico Pré-Natal. Técnicas Invasivas no Diagnóstico Pré-natal: Amniocentese e Biópsia das Vilosidades Coriônicas [Internet]. 2022 [citado 4 de Setembro de 2023]. Disponível em: <http://www.apdpn.com/pt/blog/post/tecnicas-invasivas-no-diagnostico-prenatal-amniocentese-e-biopsia-das-vilosidades-coriônicas>
47. Liao GJW, Lun FMF, Zheng YWL, Chan KCA, Leung TY, Lau TK, et al. Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem*. 2011;57(1):92–101.
48. O'Connell AE, Guseh S, Lapteva L, Cummings CL, Wilkins-Haug L, Chan J, et al. Gene and Stem Cell Therapies for Fetal Care: A Review. *JAMA Pediatr*. 2020;174(10):985–91.
49. Bose SK, Menon P, Peranteau WH. In Utero Gene Therapy: Progress and Challenges. *Trends Mol Med*. 2021;27(8):728–30.
50. Costa S, Oliveira G, Scortenschi E, Mota MC, Ramalho C, Neves AL, et al. Hidrópsia Fetal Não Imune - Consenso Clínico. *Sociedade Portuguesa de Neonatologia*. 2020.
51. Sparks TN, Lianoglou BR, Adami RR, Pluym ID, Holliman K, Duffy J, et al. Exome Sequencing for Prenatal Diagnosis in Nonimmune Hydrops Fetalis. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1746–56.
52. Coons B, Peranteau WH. Prenatal Gene Therapy for Metabolic Disorders. *Clin Obstet Gynecol*. 2021; 64(4):904–16.
53. Penati R, Fumagalli F, Calbi V, Bernardo ME, Aiuti A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I. *Journal of inherited metabolic disease*. 2017;40(4):543–54.
54. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*. 2015; 526(7573): 351–60.

55. Shahryari A, Jazi MS, Mohammadi S, Nikoo HR, Nazari Z, Hosseini ES, et al. Development and clinical translation of approved gene therapy products for genetic disorders. *Front Genet.* 2019; 10:868.
56. Ma CC, Wang ZL, Xu T, He ZY, Wei YQ. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol Adv.* 2020; 40:107502.
57. Nowakowski A, Andrzejewska A, Janowski M, Walczak P, Lukomska B. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2013;73(1):1–18.
58. Romero Z, DeWitt M, Walters MC. Promise of gene therapy to treat sickle cell disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(11):1123–36.
59. Loukogeorgakis SP, Shangaris P, Bertin E, Franzin C, Piccoli M, Pozzobon M, et al. In Utero Transplantation of Expanded Autologous Amniotic Fluid Stem Cells Results in Long-Term Hematopoietic Engraftment. *Stem Cells.* 2019;37(9):1176–88.
60. De Santis M, De Luca C, Mappa I, Cesari E, Quattrocchi T, Spagnuolo T, et al. In-utero stem cell transplantation: clinical use and therapeutic potential. *Minerva Ginecol.* 2011;63(4):387–98.
61. Mardy AH, Chetty SP, Norton ME. Maternal genetic disorders and fetal development. *Prenat Diagn.* 2020; 40(9):1056–65.
62. Spencer R, Carr D, David A. Treatment of poor placentation and the prevention of associated adverse outcomes - what does the future hold? *Prenat Diagn.* 2014;34(7):677–84.
63. Krishnan T, David AL. Placenta-directed gene therapy for fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(6):415–22.
64. Spencer R, Ambler G, Brodzki J, Diemert A, Figueras F, Gratacós E, et al. EVERREST prospective study: a 6-year prospective study to define the clinical and biological characteristics of pregnancies affected by severe early onset fetal growth restriction. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017;17(1).
65. Brownbill P, Mills T, Soydemir D, Sibley C. Vasoactivity to and Endogenous Release of Vascular Endothelial Growth Factor in the in vitro Perfused Human Placental Lobule from Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *Placenta.* 2008;29(11):950–5.
66. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649–58.
67. Savvidou MD, Yu CK, Harland LC, Hingorani AD, Nicolaides KH. Maternal serum concentration of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and vascular endothelial growth factor in women with abnormal uterine artery Doppler and in those with fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(6):1668–73.
68. Bersinger NA, Ødegård RA. Serum levels of macrophage colony stimulating, vascular endothelial, and placenta growth factor in relation to later clinical onset of pre-eclampsia and a small-for-gestational age birth. *Am J Reprod Immunol.* 2005;54(2):77–83.
69. McClain LE, Flake AW. In utero stem cell transplantation and gene therapy: Recent progress and the potential for clinical application. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; 31:88–98.
70. Basner-Tschakarjan E, Bijjiga E, Martino AT. Pre-Clinical Assessment of Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol.* 2014;5:28.

71. Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, et al. Adeno-Associated Virus Antibody Profiles in Newborns, Children, and Adolescents. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011;18(9):1586–8.
72. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science*. 2008;322(5907):1562–5
73. Mold JE, McCune JM. Immunological Tolerance During Fetal Development: From Mouse to Man. Em: Alt FW, editor. *Advances in Immunology*. Academic Press; 2012. p. 73–111.
74. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21(24):3365–9.
75. Santore MT, Roybal JL, Flake AW. Prenatal Stem Cell Transplantation and Gene Therapy. *Clin Perinatol*. 2009;36(2):451–71.
76. Ricciardi AS, Bahal R, Farrelly JS, Quijano E, Bianchi AH, Luks VL, et al. In utero nanoparticle delivery for site-specific genome editing. *Nature Communications*. 2018;9(1):2481.
77. Rossidis AC, Stratigis JD, Chadwick AC, Hartman HA, Ahn NJ, Li H, et al. In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes. *Nat Med*. 2018;24(10):1513–8.
78. Douar AM, Themis M, Sandig V, Friedmann T, Coutelle C. Effect of amniotic fluid on cationic lipid mediated transfection and retroviral infection. *Gene Ther*. 1996;3(9):789–96.
79. Garland M, Abildskov KM, Taylor S, Benzeroual K, Caspersen CS, Arroyo SE, et al. Fetal morphine metabolism and clearance are constant during late gestation. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(4):636–46.
80. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014;15(8):541–55.
81. Chaitanya K. Structure and Organization of Virus Genomes. *Genome and Genomics from Archaea to Eukaryotes*. 2019;1–30.
82. Lederer CW, Koniali L, Buerki-Thurnherr T, Papasavva PL, Grutta S La, Licari A, et al. Catching Them Early: Framework Parameters and Progress for Prenatal and Childhood Application of Advanced Therapies. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):793.
83. Ahi YS, Bangari DS, Mittal SK. Adenoviral Vector Immunity: Its Implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther*. 2011;11(4):307–20.
84. Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, Tanuri A, Delgado-Cañedo A, Bonamino MH. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *J Transl Med*. 2016;14(1).
85. National Center for Biotechnology Information. Retrovirus - Resource overview. [Internet] Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. [citado a 24 de setembro 2023] Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/retroviruses/about/>
86. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*. 2014;459(1–2):70–83.
87. Stripecke R, Kasahara N. Lentiviral and Retroviral Vector Systems. Em: Hunt KK, Vorburger SA, Swisher SG, editores. *Cancer Drug Discovery and Development: Gene Therapy for Cancer*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2007; p. 39–71
88. Nance ME, Duan D. Gene Therapy: Use of Viruses as Vectors. Reference Module in Biomedical Sciences. 2018.

89. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):53.
90. Girard A, Verhoeven E. Lentiviral Vectors Design and Applications. Em: Smyth Templeton N, editor. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. 4.<sup>a</sup> edição. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2015. p. 3–28.
91. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*. 2012;443(3):603–18.
92. Tomás HA, Rodrigues AF, Alves PM, Coroadinha AS, Tomás HA, Rodrigues AF, et al. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. Em: Molina FM, editor. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*. Rijeka: IntechOpen; 2013. p. 287–317.
93. Milone MC, O’Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*. 2018;32(7):1529–41.
94. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998;72(11):8463–71.
95. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*. 2001;7(1):33–40.
96. Ellison SM, Liao A, Wood S, Taylor J, Youshani AS, Rowlston S, et al. Pre-clinical Safety and Efficacy of Lentiviral Vector-Mediated Ex Vivo Stem Cell Gene Therapy for the Treatment of Mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019; 13:399–413.
97. Shangaris P, Loukogeorgakis SP, Subramaniam S, Flouri C, Jackson LH, Wang W, et al. In Utero Gene Therapy (IUGT) Using GLOBE Lentiviral Vector Phenotypically Corrects the Heterozygous Humanised Mouse Model and Its Progress Can Be Monitored Using MRI Techniques. *Scientific Reports*. 2019;9(1):11592.
98. Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2013;24(2):132–42.
99. Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV. Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2015; 17:63-89.
100. Nemerow GR, Stewart PL, Reddy VS. Structure of human adenovirus. *Curr Opin Virol*. 2012;2(2):115–21.
101. Davison AJ, Benkő M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*. 2003;84(11):2895–908.
102. Majhen D, Ambriović-Ristov A. Adenoviral vectors—How to use them in cancer gene therapy? *Virus Res*. 2006;119(2):121–33.
103. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*. 2004;6(S1): S164–71.
104. Sakhuja K, Connelly S, Reddy PS, Ganesh S, Cantaniag F, Pattison S, et al. Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2003; 14(3):243–54.
105. Atchison RW, Casto BC, Hammon WMD. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*. 1965;149(3685):754–6.
106. Knipe D, Howley P. *Fields virology*. 5.<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
107. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358–78.

108. Sonntag F, Köther K, Schmidt K, Weghofer M, Raupp C, Nieto K, et al. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. *J Virol.* 2011;85(23):12686–97.
109. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(22):10220–5.
110. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017;31(4):317–34.
111. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017; 8:87–104.
112. Chan JKY, Gil-Farina I, Johana N, Rosales C, Tan YW, Ceiler J, et al. Therapeutic expression of human clotting factors IX and X following adeno-associated viral vector-mediated intrauterine gene transfer in early-gestation fetal macaques. *The FASEB Journal.* 2019;33(3):3954–67.
113. Joyeux L, Danzer E, Limberis MP, Zoltick PW, Radu A, Flake AW, et al. In utero lung gene transfer using adeno-associated viral and lentiviral vectors in mice. *Hum Gene Ther Methods.* 2014 ;25(3):197–205.
114. Wong SP, Argyros O, Harbottle RP. Vector systems for prenatal gene therapy: Principles of non-viral vector design and production. Em: Coutelle C, Waddington S, editores. *Prenatal Gene Therapy Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2012. p. 133–67.
115. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *Journal of clinical and diagnostic research.* 2015;9(1):GE01–6.
116. Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(5):733–53.
117. Dal Maschio M, Ghezzi D, Bony G, Alabastri A, Deidda G, Brondi M, et al. High-performance and site-directed in utero electroporation by a triple-electrode probe. *Nature Communications.* 2012;3(1).
118. De Vry J, Martínez-Martínez P, Losen M, Temel Y, Steckler T, Steinbusch HWM, et al. In vivo electroporation of the central nervous system: A non-viral approach for targeted gene delivery. *Prog Neurobiol.* 2010;92(3):227–44.
119. Takeda H, Miwa T, Kim MY, Choi BY, Orita Y, Minoda R. Prenatal electroporation-mediated gene transfer restores Slc26a4 knock-out mouse hearing and vestibular function. *Scientific Reports.* 2019;9: 17979.
120. Gascón AR, Pozo-Rodríguez A del, Solinís MA, Gascón AR, Pozo-Rodríguez A del, Solinís MA. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. Em: Molina FM, editor. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications.* IntechOpen; 2013.
121. Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.* 2007;14(2):99–107.
122. Sayed N, Allawadhi P, Khurana A, Singh V, Navik U, Pasumarthi SK, et al. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci.* 2022; 294:120375.
123. Kulkarni JA, Cullis PR, Van Der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(3):146–57.
124. Patil S, Gao YG, Lin X, Li Y, Dang K, Tian Y, et al. The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5491.

125. Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A. Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;109:184–93.
126. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: Part II. Gene therapy strategies and applications. *Discov Med*. 2014;18(98):151–61.
127. Flomenberg P, Daniel R. Overview of gene therapy, gene editing, and gene silencing. UpToDate, Waltham, MA. 2023.
128. Smith AJ, Carter SP, Kennedy BN. Genome editing: the breakthrough technology for inherited retinal disease? *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(10):1245–54.
129. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806–11.
130. Ozcan G, Ozpolat B, Coleman RL, Sood AK, Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:108–19.
131. Torrecilla J, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, Del Pozo-Rodríguez A. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:161794.
132. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–55.
133. Bobbin ML, Rossi JJ. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;56:103–22.
134. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(9):746–59.
135. Romano PR, McCallus DE, Pachuk CJ. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006;25(27):3857–65.
136. Evers MM, Toonen LJA, van Roon-Mom WMC. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:90–103.
137. Chan JHP, Lim S, Wong WSF. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:533–40.
138. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*. 2003;270(8):1628–44.
139. Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(1):9–21.
140. Mansoor M, Melendez AJ. Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul Syst Bio*. 2008; 2:275–95.
141. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(6):468–79.
142. Monia B, Lesnik E, Gonzalez C, Lima W, McGee D, Guinosso C, et al. Evaluation of 2'-Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxy Gaps as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(19):14514–22.
143. Wu H, Lima WF, Zhang H, Fan A, Sun H, Crooke ST. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17181–9.
144. Rossor AM, Reilly MM, Sleight JN. Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple. *Pract Neurol*. 2018;18(2):126–31.

145. Lentz JJ, Jodelka FM, Hinrich AJ, Mccaffrey KE, Farris HE, Spalitta MJ, et al. Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nat Med.* 2013;19(3):345–50.
146. Hung G, Xiao X, Peralta R, Bhattacharjee G, Murray S, Norris D, et al. Characterization of target mRNA reduction through in situ RNA hybridization in multiple organ systems following systemic antisense treatment in animals. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23(6):369–78.
147. Zhang B, Arun G, Mao YS, Lazar Z, Hung G, Bhattacharjee G, et al. The lncRNA Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult. *Cell Rep.* 2012;2(1):111–23.
148. Depreux FF, Wang L, Jiang H, Jodelka FM, Rosencrans RF, Rigo F, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the amniotic cavity in utero modulate gene expression in the postnatal mouse. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(20):9519–29.
149. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science.* 2018;359(6372):eaan4672.
150. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics.* 2014;15(5):321–34.
151. Shim G, Kim D, Park GT, Jin H, Suh SK, Oh YK. Therapeutic gene editing: delivery and regulatory perspectives. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(6):738–53.
152. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015;21(2):121–31.
153. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1).
154. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013;31(7):397–405.
155. Costa JR, Bejcek BE, McGee JE, Fogel AI, Brimacombe KR, Ketteler R. Genome Editing Using Engineered Nucleases and Their Use in Genomic Screening. Em: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, editores. *Assay Guidance Manual.* Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2017.
156. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55.
157. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467–77.
158. Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Ju X Da. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *Journal of Genetics and Genomics.* 2016;43(2):63–75
159. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819–23.
160. Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2014;32(7):670–6.
161. Gao Y, Zhao Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol.* 2014;56(4):343–9.
162. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife.* 2013;2:e00471.

163. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2281–308.
164. Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*. 2014;3:e04766.
165. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533(7603):420–4.
166. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464–71.
167. Zhao Z, Shang P, Mohanraju P, Geijsen N. Prime editing: advances and therapeutic applications. *Trends Biotechnol*. 2023;41(8):1000–12.
168. De Laet C, Dionisi-Vici C, Leonard J V, Mckiernan P, Mitchell G, Monti L, et al. Recommendations for the management of tyrosinaemia type 1. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:8.
169. Oliveira JF, Rodrigues M, Costa C, Janeiro P, Almeida IT, Vilarinho L, et al. Tirosinemia Tipo 1: O Passado e o Presente Numa Unidade de Doenças Metabólicas. *Acta Pediátrica Médica*. 2016;47(4):325–31.
170. Sniderman King L, Trahms C, Scott C. Tyrosinemia Type I. Em: Adam M, Mirzaa G, Pagon R, Wallace S, JH Bean L, Gripp K, et al., editores. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington; 2006 [citado 21 de Agosto de 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1515/>
171. Orphanet. Tirosinemia tipo 1 [Internet]. 2007 [citado 21 de Agosto de 2023]. Disponível em: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=PT&Expert=882](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=PT&Expert=882)
172. Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, et al. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6366–71.
173. Alapati D, Zacharias WJ, Hartman HA, Rossidis AC, Stratigis JD, Ahn NJ, et al. In utero gene editing for monogenic lung disease. *Sci Transl Med*. 2019;11(488).
174. Ricciardi AS, Quijano E, Putman R, Saltzman WM, Glazer PM. Peptide Nucleic Acids as a Tool for Site-Specific Gene Editing. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*. 2018;23(3):632.
175. Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):124.
176. Jędrzejowska M, Kostera-Pruszczyk A. Spinal muscular atrophy - new therapies, new challenges. *Neurol Neurochir Pol*. 2020;54(1):8–13.
177. Stabley DL, Holbrook J, Scavina M, Crawford TO, Swoboda KJ, Robbins KM, et al. Detection of SMN1 to SMN2 gene conversion events and partial SMN1 gene deletions using array digital PCR. *Neurogenetics*. 2021;22(1):53–64.
178. Groen EJM, Talbot K, Gillingwater TH. Advances in therapy for spinal muscular atrophy: promises and challenges. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(4):214–24.
179. Ravi B, Chan-Cortés MH, Sumner CJ. Gene-Targeting Therapeutics for Neurological Disease: Lessons Learned from Spinal Muscular Atrophy. *Annu Rev Med*. 2021;72:1–14.
180. Chaytow H, Faller KME, Huang YT, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: From approved therapies to future therapeutic targets for personalized medicine. *Cell Rep Med*. 2021;2(7):100346.

181. Rashnonejad A, Amini Chermahini G, Gündüz C, Onay H, Aykut A, Durmaz B, et al. Fetal Gene Therapy Using a Single Injection of Recombinant AAV9 Rescued SMA Phenotype in Mice. *Mol Ther.* 2019;27(12):2123–33.
182. Horowitz ED, Rahman KS, Bower BD, Dismuke DJ, Falvo MR, Griffith JD, et al. Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. *J Virol.* 2013;87(6):2994–3002.
183. Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol.* 2000;74(20):9451–63.
184. Kong L, Valdivia DO, Simon CM, Hassinan CW, Delestrée N, Ramos DM, et al. Impaired prenatal motor axon development necessitates early therapeutic intervention in severe SMA. *Sci Transl Med.* 2021;13(578).
185. Sun A. Lysosomal storage disease overview. *Ann Transl Med.* 2018;6(24):476.
186. Gaffke L, Pierzynowska K, Podlacha M, Brokowska J, Węgrzyn G. Changes in cellular processes occurring in mucopolysaccharidoses as underestimated pathomechanisms of these diseases. *Cell Biol Int.* 2021;45(3):498–506.
187. Quittot N, Sebastiao M, Bourgault S. Modulation of amyloid assembly by glycosaminoglycans: from mechanism to biological significance. *Biochem Cell Biol.* 2017;95(3):329–37.
188. Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Mucopolissacaridose tipo I ou Síndrome de Hurler/Hurler-Scheie/Scheie - Informação ao doente [Internet]. 2019 [citado 5 de Setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/06/MucopolissacaridosetipoI.pdf>
189. Hampe CS, Wesley J, Lund TC, Orchard PJ, Polgreen LE, Eisengart JB, et al. Mucopolysaccharidosis Type I: Current Treatments, Limitations, and Prospects for Improvement. *Biomolecules.* 2021;11(2):189:1–24.
190. Bose SK, White BM, Kashyap M V., Dave A, De Bie FR, Li H, et al. In utero adenine base editing corrects multi-organ pathology in a lethal lysosomal storage disease. *Nat Commun.* 2021;12(1):4291.
191. Zhou J, Lin J, Leung WT, Wang L. A basic understanding of mucopolysaccharidosis: Incidence, clinical features, diagnosis, and management. *Intractable Rare Dis Res.* 2020;9(1):1–9.
192. Karolewski BA, Wolfe JH. Genetic correction of the fetal brain increases the lifespan of mice with the severe multisystemic disease mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther.* 2006;14(1):14–24.
193. Platt FM. Sphingolipid lysosomal storage disorders. *Nature.* 2014;510:68–75.
194. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Gaucher Disease. [Internet] Bethesda: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. [citado 6 de Setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/gaucher-disease>
195. Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, Makris M, Coffin D, Herr C, et al. Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males: A Meta-analytic Approach Using National Registries. *Ann Intern Med.* 2019;171(8):540–6.
196. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia.* 2020;26 Suppl 6:1–158.
197. Buckley SMK, David AL. Gene Therapy: Principles and Clinical Potential. Em: Kilby M, Johnson A, Oepkes D, editores. *Fetal Therapy: Scientific Basis and*

- Critical Appraisal of Clinical Benefits. 2<sup>a</sup> edição. Cambridge: Cambridge University Press; 2020. p. 540–60.
198. European Medicines Agency. Roctavian [Internet]. [citado 10 de Setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/roctavian-0>
  199. European Medicines Agency. Hemgenix [Internet]. [citado 10 de Setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hemgenix#overview%20section>
  200. Rodriguez M, Trevisan B, George S, Ramamurthy RM, Rabah A, Shields JE, et al. Administration of Cells Engineered to Secrete Fviii-mcoET3 in Prenatal Sheep Recipients Results in Sustained Curative Fviii Plasma Levels for 3 Years after Birth, without Immune or Toxicity-Related Adverse Events. *Blood*. 2020;136(Supplement 1):1–2.
  201. Sabatino DE, MacKenzie TC, Peranteau W, Edmonson S, Campagnoli C, Liu YL, et al. Persistent expression of hF.IX After tolerance induction by in utero or neonatal administration of AAV-1-F.IX in hemophilia B mice. *Mol Ther*. 2007;15(9):1677–85.
  202. David AL, McIntosh J, Peebles DM, Cook T, Waddington S, Weisz B, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated in utero gene transfer gives therapeutic transgene expression in the sheep. *Hum Gene Ther*. 2011;22(4):419–26.
  203. Mattar CNZ, Nathwani AC, Waddington SN, Dighe N, Kaeppl C, Nowrouzi A, et al. Stable human FIX expression after 0.9G intrauterine gene transfer of self-complementary adeno-associated viral vector 5 and 8 in macaques. *Mol Ther*. 2011;19(11):1950–60.
  204. Mattar CNZ, Gil-Farina I, Rosales C, Johana N, Tan YYW, McIntosh J, et al. In Utero Transfer of Adeno-Associated Viral Vectors Produces Long-Term Factor IX Levels in a Cynomolgus Macaque Model. *Mol Ther*. 2017;25(8):1843–53.
  205. Risoluti R, Colah R, Materazzi S. Editorial: Frontiers in hemoglobinopathies: New insights and methods. *Front Mol Biosci*. 2021;8:632916.
  206. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 2008;86(6):480–7
  207. Horvei P, MacKenzie T, Kharbanda S. Advances in the management of  $\alpha$ -thalassemia major: reasons to be optimistic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021;2021(1):592–9.
  208. Harteveld CL, Achour A, Arkesteijn SJG, ter Huurne J, Verschuren M, Bhagwandien-Bisoen S, et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *Int J Lab Hematol*. 2022;44(Suppl 1):28–36.
  209. Zittersteijn HA, Harteveld CL, Klaver-Flores S, Lankester AC, Hoeben RC, Staal FJT, et al. A Small Key for a Heavy Door: Genetic Therapies for the Treatment of Hemoglobinopathies. *Front Genome Ed*. 2021;2:617780.
  210. White BM, Morrissey EE, Peranteau WH. In Utero Gene Editing for Inherited Lung Diseases. *Curr Stem Cell Rep*. 2022;8:44–52.
  211. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021;397(10290):2195–211.
  212. Dickinson KM, Collaco JM. Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev*. 2021;42(2):55–65.
  213. Taylor-Cousar JL. CFTR Modulators: Impact on Fertility, Pregnancy, and Lactation in Women with Cystic Fibrosis. *J Clin Med*. 2020;9(9):2706.

214. McNeer NA, Anandalingam K, Fields RJ, Caputo C, Kopic S, Gupta A, et al. Nanoparticles that deliver triplex-forming peptide nucleic acid molecules correct F508del CFTR in airway epithelium. *Nat Commun.* 2015;6:6952.
215. Allen L, Allen L, Carr SB, Davies G, Downey D, Egan M, et al. Future therapies for cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2023;14(1):693.
216. Associação Nacional de Fibrose Quística. Como se diagnostica [Internet]. [citado 11 de Setembro de 2023]. Disponível em: <http://www.anfq.pt/o-que-e-a-fibrose%20quistica/como-se-diagnostica/>
217. Chua P, Zhou S, Richmond M, Romano S. An Update on In Utero Gene Therapy for Cystic Fibrosis. *Georgetown Medical Review.* 2020;4(1).
218. Gupta A, Zheng SL. Genetic disorders of surfactant protein dysfunction: when to consider and how to investigate. *Arch Dis Child.* 2017;102(1):84–90.
219. Nogee LM. Genetic causes of surfactant protein abnormalities. *Curr Opin Pediatr.* 2019;31(3):330–9.
220. Cooney AL, Wambach JA, Sinn PL, McCray PBJr. Gene Therapy Potential for Genetic Disorders of Surfactant Dysfunction. *Front Genome Ed.* 2022;3:785829.
221. Zwiers C, Lindenburg ITM, Klumper FJ, de Haas M, Oepkes D, Van Kamp IL. Complications of intrauterine intravascular blood transfusion: lessons learned after 1678 procedures. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(2):180–6.
222. Coutelle C, Ashcroft R. Risks, benefits and ethical, legal, and societal considerations for translation of prenatal gene therapy to human application. Em: Coutelle C, Waddington S, editores. *Prenatal Gene Therapy Methods in Molecular Biology.* 1ª edição. Humana Press, Totowa, NJ; 2012. p. 371–87.
223. Themis M, Waddington SN, Schmidt M, von Kalle C, Wang Y, Al-Allaf F, et al. Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol Ther.* 2005;12(4):763–71.
224. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors. Londres; 2006.
225. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM); Shanahan MA, Aagaard KM, McCullough LB, Chervenak FA, Shamshirsaz AA. Society for Maternal-Fetal Medicine Special Statement: Beyond the scalpel: in utero fetal gene therapy and curative medicine. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;225(6):B9-B18.
226. McGovern N, Shin A, Low G, Duan K, Yao LJ, Msallam R, et al. Human fetal dendritic cells promote prenatal T-cell immune suppression through arginase-2. *Nature* 2017; ; 546(7660): 662–6.
227. Li N, Van Unen V, Abdelaal T, Guo N, Kasatskaya SA, Ladell K, et al. Memory CD4<sup>+</sup> T cells are generated in the human fetal intestine. *Nat Immunol* 2019;20(3):301–12.
228. Chougnet CA. Human fetal immune cells fight back. *Sci Transl Med* 2018; 10(438).