

Terapia génica: Sistemas de Entrega, Mecanismos Moleculares e Abordagens Terapêuticas Aprovadas

Carolina Biscaia

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor Clévio Nobrega

2020



Terapia génica: Sistemas de Entrega, Mecanismos Moleculares e Abordagens Terapêuticas Aprovadas

Carolina Biscaia

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor Clévio Nobrega

2020

Resumo

Desde o reconhecimento do gene como a unidade básica do DNA, da hereditariedade e da genética, a capacidade para fazer modificações específicas no genoma humano tem sido um objetivo para a comunidade científica. A terapia génica, através da adição, silenciamento, substituição ou edição de genes, pretende modificar o prognóstico de patologias, através da inserção de ácidos nucleicos, com recurso a sistemas de entrega com características distintas, nos alvos terapêuticos correspondentes.

Diversas melhorias ao nível dos sistemas de entrega (ditos vectores), quer virais, quer não virais, como métodos físicos ou químicos, têm como objetivo aumentar a eficácia e segurança, promovendo a obtenção de benefício terapêutico, com o desafio constante de evitar respostas imunes ou efeitos tóxicos indesejados.

Após a descoberta de mecanismos de transferência genética através da transdução, por Ledeborg em 1952, até à primeira transferência de genes aprovada em humanos, por Rosenberg em 1989, a terapia génica já se tornou uma realidade, com cerca de 232 ensaios clínicos aprovados só em 2018 e com terapêuticas diversas, na abordagem de doenças monogénicas, cardiovasculares, oncológicas, infecciosas e neurológicas, entre outras.

A atual dissertação tem como propósito, apresentar uma revisão bibliográfica atualizada da evolução da terapia génica, analisando e comparando as diferentes metodologias de administração, sistemas de entrega e estratégias terapêuticas, bem como a abordagem de terapêuticas atualmente aprovadas, cuja implementação veio alterar o rumo clínico de determinadas patologias. Pretende-se também analisar perspetivas futuras e avanços que auxiliem o desenvolvimento de novas terapias génicas, que melhorem o tratamento e a qualidade de vida dos doentes.

Palavras-chave: Terapia Génica, Vectores Virais, Vectores Não-Virais, CRISPR/Cas9, Strimvelis, Spinraza.

Abstract

Since the establishment of genes as the basic unit of DNA, heredity and genetics, the ability to make specific changes to the human genome has been a milestone for the scientific community. Through addition, silencing, replacement or gene edition, gene therapy aims to modify the prognosis of diseases, through the insertion of nucleic acids, using delivery systems with distinct characteristics, in the corresponding therapeutic targets.

Improvements in terms of the delivery systems (called vectors), whether viral or non-viral, such as physical methods or chemical methods, aimed to increase the efficacy and safety, which are both fundamental aspects for obtaining therapeutic benefit, with the constant challenge of avoiding unwanted immune and toxic responses.

After the discovery of gene transfer mechanisms through transduction, by Lederberg in 1952, until the first approved gene transfer in humans, by Rosenberg in 1989, this therapy as already become a reality, with about 232 clinical trials of gene therapy approved just in 2018 and a wide variety of therapeutic approaches for the treatment of monogenetic, cardiovascular, oncological, infectious and neurological diseases, among others.

The present dissertation aims to present na updated bibliographic review of the evolution of gene therapy, analyzing and comparing different administration methodologies, delivery systems and therapeutic strategies, as well as currently approved therapeutic approach, whose implementation has changed the course of certain pathologies. It is also intended to analyze future perspectives and advances that help the development of new gene therapies, which will improve the treatment and the life quality of patients.

Keywords: Gene Therapy, Viral Vectors, Non Viral Vectors, CRISPR/Cas9, Strimvelis, Spinraza.

Índice de Conteúdo

Resumo	i
Abstract	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1. Introdução	1
1.1. A Terapia Génica	1
1.1.1. Evolução da Terapia Génica	3
2. Metodologias de Administração	7
2.1. Sistemas <i>Ex Vivo</i>	7
2.2. Sistemas <i>In Vivo</i>	9
2.2.1. Entrega Sistémica	10
2.2.2. Entrega Local ou <i>In situ</i>	11
3. Vectores de Entrega	13
3.1. Sistemas de Entrega Não-Virais	14
3.1.1. Sistemas Não-Virais Físicos	15
3.1.2. Sistemas Não-Virais Químicos	18
3.2. Sistemas de Entrega Virais	25
3.2.1. Vectores Adenovirais	26
3.2.2. Vectores Adeno-Associados	28
3.2.3. Vectores Retrovirais	31
3.2.4. Outros Vectores Retrovirais	34
4. Estratégias Terapêuticas	37
4.1. Transferência de Genes	37
4.2. Silenciamento de Genes	38
4.2.1. RNA de Interferência	39
4.2.2 – Oligonucléotidos Antisense	42
4.4.3. Ribozimas e Aptâmeros	45
4.3. Edição de Genes	46
4.2.1. Meganucleases	47

4.2.2. Nucleases Dedos de Zinco	47
4.2.3. TALEN	48
4.2.4. CRISPR/Cas9	49
5. Terapêuticas Aprovadas	53
5.1. Strimvelis	53
5.1.1- Eficácia e Segurança Clínica	54
5.1.2- Particularidades Clínicas	55
5.1.3- Composição Qualitativa e Quantitativa	57
5.2. Spinraza	58
5.2.1- Eficácia e Segurança Clínica	59
5.2.2- Particularidades Clínicas	59
6. Contexto Social e Económico	61
7. Conclusão	63
8. Referências Bibliográficas	65

Índice de Figuras

Figura 1.1- Gráfico representativo dos ensaios clínicos em terapia génica aprovados até Dezembro de 2018.	6
Figura 2.1 – Vias de administração na terapia génica	10
Figura 3.1- Vectores utilizados em ensaios clínicos com terapia génica por número e percentagem – dados atualizados em Setembro de 2019	14
Figura 3.2 – Exemplo da estrutura de um lipídeo catiónico, baseada no 2,3-bis[oleyl]oxipropyltrimethylammonium chloride (DOTMA)	19
Figura 3.3 – Exemplos de lipossomas catiónicos	20
Figura 3.4 - Exemplos de polímeros catiónicos	23
Figura 3.5- Representação esquemática do genoma do serótipo 5 de adenovírus	27
Figura 3.6- Representação esquemática do genoma do wild-type do AAV2	29
Figura 3.7 – Representação do genoma de um retrovirus e de um lentivírus	32
Figura 3.8 – Representação de um vector baseado em lentivírus de terceira geração	33
Figura 4.1- Representação esquemática da transferência de genes por substituição ou por adição	38
Figura 4.2- Mecanismo de silenciamento de genes baseado em RNA de Interferência	41
Figura 4.3- Silenciamento de genes baseado em oligonucleótidos antisense (ASOs)	44
Figura 4.4- Imagem esquemática de estratégias usadas na edição de genes	51
Figura 5.1 – Esquema representativo da eficácia de Strimvelis	55

Índice de Tabelas

Tabela I- Principais Vantagens e Desvantagens de Sistemas de Entrega Não Virais Físicos e Químicos	24
Tabela II- Principais Características dos Sistemas de Entrega Virais	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

ΔLNGFR- Recetor do Fator de Crescimento do Nervo de Baixa Afinidade, do inglês *low-affinity nerve growth factor receptor*

AAV- Vírus Adeno-Associados, do inglês *adeno-associated virus*

Ad- Vectores baseados no adenovírus

AD- Doença de Alzheimer, do inglês *Alzheimer's Disease*

ADA- Adenosina Deaminase, do inglês *Adenosine Deaminase*

ADA-SCID- Deficiência de Adenosina Deaminase, do inglês *Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency*

ADME-Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção

AIM- Autorização de Introdução no Mercado

ASOs- Oligonucleotídeos Antisense, do inglês *Antisense Oligonucleotides*

CAR- Receptor de Antígeno Quimérico de células, do inglês *Chimeric Antigen Receptor*)

cdNA- Ácido desoxirribonucleico complementar

CFDA- *China Food and Drug Administration*

CHMP- Comité de Medicamentos para Uso Humano

CNS- Sistema Nervoso Central, do inglês *central nervous system*

DMD - Distrofia Muscular de Duchenne, do inglês *Duchenne muscular dystrophy*

DNA- Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

EBV- Vírus Epstein-Bar, do inglês *Epstein-Barr Virus*

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

EUA- Estados Unidos da América

FDA- *Food and Drug Administration*

HCC- Carcinoma Hepatocelular, do inglês *hepatocellular carcinoma*

HD- Doença de Huntington, do inglês *Huntington Disease*

HGPRT- Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, do inglês *Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase*

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *human immunodeficiency virus*

HSC- Células Estaminais Hematopoiéticas, do inglês *Hematopoietic Stem Cells*

HSV-tk - Timidina cinase do vírus herpes simplex do tipo 1, do inglês *herpes simplex virus thymidine kinase*

iRNA- RNA de interferência, do inglês *interference RNA*

ITR- Repetições Terminais Invertidas, do inglês *inverse terminal repeat*

kbp- Quilo pares de bases, do inglês *kilo base pairs*

LPL- Lipoproteína Lipase

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

MERTK- Proteína Tirosina-Cinase MER, do inglês *tyrosine-protein kinase MER*

miRNA- MicroRNA, do inglês *microRNA*

MN- Meganucleases

mRNA- RNA mensageiro, do inglês *messenger RNA*

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

NGF- Fator de Crescimento associado aos Neurónios, do inglês *Nerve Growth Factor*

NK- Linfócitos NK, do inglês *Natural Killer Cell*

NSCL- Cancro de pulmão de não pequenas células, do inglês *non-small-cell lung carcinoma*

OTC- Deficiência parcial de Ornitina Transcarbamilase, do inglês *Ornithine Transcarbamilase Deficiency*

PAMAM- Poliamidoamina

pDNA- DNA plasmídeo, do inglês *plasmid DNA*

PEI- Polietilenoimina, do inglês *Polyethylenimine*

PS- Oligonucléotidos Fosforotioato, do inglês *phosphorothioate oligonucleotidos*

PTGS- Silenciamento de Genes Pós-transcrição, do inglês *Post-transcriptional Gene Silencing*

RISC- Complexo Endógeno de Silenciamento Induzido por RNA, do inglês *RNA induced silencing complex*

RNA- Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

Rnase H- Ribonuclease H

RSV- Vírus do Sarcoma Rous, do inglês *Rous Sarcoma Virus*

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

shRNA- RNA em gancho, do inglês *short hairpin RNA*

siRNA- Pequenas Moléculas de RNA interferência, do inglês *small interfering RNA*

SMA- Atrofia Muscular Espinhal, do inglês *spinal muscular atrophy*

SMN- Gene de Sobrevivência do Neurônio Motor 1, do inglês *Survival Motor Neuron 1*

SPV- Vírus do Papiloma Shope, do inglês *Shope Papilloma Virus*

TGS- Silenciamento de Genes Transcricional, do inglês *Transcriptional Gene Silencing*

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*

ZFN- Nucleases Dedos de Zinco, do inglês *zinc finger nucleases*

1. Introdução

1.1. A Terapia Génica

A compreensão e o conhecimento da influência da genética e dos genes na definição de um organismo e a forma como modificações na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) podem originar alterações estruturais e metabólicas, é um dos dogmas centrais da genética e da biologia molecular e celular. Da mesma forma, a descoberta de genes associados a características patológicas tornou-se um dos fatores determinantes para o desenvolvimento da terapia génica [1].

A terapia génica recorre ao uso de ácidos nucleicos como estratégia terapêutica e consiste na substituição, adição, silenciamento ou edição de genes, com o objetivo de curar ou modificar a progressão de doenças. A Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) define um medicamento com base em terapia génica como, “*um medicamento biológico que contém uma substância ativa que consiste num ácido nucleico recombinante utilizado ou administrado em seres humanos com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar ou excluir uma sequência genética*”. Refere também que, “*o efeito terapêutico, profilático ou de diagnóstico está diretamente relacionado com a sequência do ácido nucleico, ou ao produto da expressão genética dessa sequência* [2], [3].

A aplicação de uma terapia génica baseia-se na evolução da história natural de uma doença, principalmente de uma perspetiva etiológica, podendo incidir do ponto de vista teórico, ao nível das células somáticas ou germinativas. Na prática, a modificação de células da linha germinativa não é atualmente permitida, uma vez que a transmissão das alterações para a descendência pode afetar o desenvolvimento das gerações futuras de forma irreversível e ainda desconhecida. A aplicação da estratégia terapêutica de base génica pode ser realizada *ex vivo*, onde se utilizam células geneticamente modificadas para posterior transplantação (do próprio doente) ou *in vivo*, na qual a introdução do material genético é efetuada diretamente nas células/tecidos do organismo [2], [4], [5].

Através da entrega de material genético, na maioria das vezes transportado por um vector, e após obtenção do resultado clínico esperado, a expressão de um gene em

células/tecidos alvo específicos, faz com que a terapia génica seja uma terapêutica promissora para o tratamento de diversas doenças genéticas e adquiridas. Dentro dos diversos tipos de vectores que podem ser utilizados para a entrega de ácidos nucleicos destacam-se os vectores virais, que consistem em vírus alterados geneticamente de forma a aumentar a sua segurança, para a consequente utilização clínica. Vectores virais como o adenovírus ou retrovírus são os mais usados nos ensaios clínicos. Os vectores não virais, nomeadamente físicos ou químicos, podem também ser utilizados para a entrega de material genético, no entanto, problemas de eficácia limitam a sua utilização de forma mais expressiva [6]–[10].

A transferência de genes envolve vários passos cruciais e dos quais depende o sucesso da terapêutica que, por sua vez, se encontram em constante otimização. Propriedades de ADME – absorção, distribuição, metabolização e excreção para classificação de terapêuticas e substâncias ativas, não podem ser aplicadas de forma linear em produtos de terapia génica. Assim, foram propostos parâmetros que envolvem a importância de alcançar as células alvo, a eficiência de transdução, a expressão da transferência e a duração da expressão do gene de interesse. Além disso, características como, por exemplo, identificação e desenho de vectores, captação celular dos vectores utilizados ou melhoria dos sistemas de entrega, identificação de novos alvos terapêuticos, capacidade de evitar os sistemas intracelulares de degradação, translocação para o núcleo, tradução do material genético e terapêutico, garantir a expressão regulada de genes e a resposta do sistema imunitário do hospedeiro são também de extrema importância para a eficácia e segurança da terapia génica [4], [9]–[12].

Do ponto de vista teórico, a terapia génica pode ser aplicada a qualquer doença que tenha como origem a modificação de um fator genético ou até em patologias com etiologia multifatorial: a hipercolesterolemia, por exemplo, ou então algumas doenças neurodegenerativas ou doenças infecciosas. É essencial referir que a maior parte dos ensaios clínicos aprovados hoje em dia com base na terapia génica estão relacionados com condições como o cancro, doenças genéticas e doenças cardiovasculares. Segundo dados de 2017, cerca de 132 ensaios clínicos já se encontravam aprovados e com resultados promissores para a β -Talassemia, Imunodeficiência Combinada Severa ligada ao X (SCID-X1, do inglês *X-linked Severe Combined Immunodeficiency*), Deficiência de Adenosina Deaminase (ADA-SCID, do inglês *Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency*), Hemofilia B e Síndrome de Wiskott-Aldrich [2], [4], [7], [8], [13].

1.1.1. Evolução da Terapia Génica

Mesmo antes da sequenciação completa do genoma humano, as aplicações da terapia génica já eram discutidas, bem como as suas potenciais limitações. No entanto, a sequenciação do DNA e o isolamento de genes contribuíram de forma decisiva para o conhecimento da variabilidade genética associada a diversas patologias, tal como o papel que cada um destes podia desenvolver na fisiologia humana, tendo este conhecimento potenciado o desenvolvimento da terapia génica [14].

A descoberta de que os bacteriófagos podiam transferir material genético, por Zinder e Lederberg em 1952 e, a consequente pesquisa por Waclaw Szybalski em como os genes eram transferidos, modificados e regulados, podem ser considerados os primeiros passos na história e no desenvolvimento da terapia génica. Szybalski, em 1962, demonstrou a primeira transferência hereditária de genes, com base na via alternativa para a síntese de ácidos nucleicos, principalmente a purina, que utiliza a enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT, do inglês *Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase*). Utilizando a linha celular D98/AH2, na qual, algumas células expressavam a enzima HGPRT e outras não, conseguiu isolar o DNA das células que expressavam HGRPT e transformar células com deficiência em HGPRT, demonstrando que uma mutação genética pode ser resolvida pela transferência de DNA funcional. Além disso, demonstrou também que, esta transferência poderia ser hereditária, uma vez que as células filhas apresentavam o mesmo fenótipo [15], [16].

Howard Temin, em 1961, reforça o conhecimento de que as mutações genéticas podiam ser herdadas de forma estável. Com recurso a células embrionárias de galinha infetadas com vírus do Sarcoma Rous (RSV, do inglês *Rous Sarcoma Virus*) concluiu que estas herdavam o genoma do RSV; no entanto, não havia ativação dependente do ciclo celular nem libertação do vírus. Este estudo permitiu evidenciar a eficiência da transformação genética exógena e que o material genético transferido era integrado de forma estável. Além disso, realça a importância dos vírus para a entrega de genes em células de interesse [7], [17], [18].

O primeiro ensaio clínico realizado em seres humanos, a duas raparigas com hiperargininemia, uma doença metabólica hereditária no ciclo da ureia, foi coordenado por Rogers e Pfuderer em 1968. A partir do *wild type* do vírus do papiloma Shope (SPV,

do inglês *Shope Papilloma Virus*), o qual se esperava ter o gene codificante para a arginase, investigaram a possibilidade de introduzir e expressar este gene. Apesar de ter sido possível confirmar o uso de vírus para a transferência de genes exógenos, os resultados terapêuticos não foram promissores [7], [19].

Posteriormente, Martin Cline em 1979 conseguiu introduzir o gene que codifica para a β -globulina humana, na medula óssea de murganhos. Devido ao sucesso do estudo, em 1998, plasmídeos que continham o gene referido foram transferidos, *in vitro*, para células de doentes com β -talassemia, uma doença genética que provoca anemia hemolítica. Esta investigação não tinha autorização, sendo fortemente criticada pela comunidade científica e levantou discussões éticas sobre as consequências da manipulação genética pelo Homem [18], [20].

Em 1989, Rosenberg e colegas realizaram a primeira transferência aprovada de genes exógenos no ser humano, ao usar o Vírus da Leucemia Murina (MVL, do inglês *Murine Leukemia Virus*), o primeiro vector retroviral a ser modificado, no qual foi inserido o gene marcador resistente à neomicina, em linfócitos infiltrantes de tumor, que foram re-administradas aos doentes com melanomas metastáticos. Este estudo, apesar de ter uma amostra pequena e efeitos anti-tumorais temporários, confirmou a viabilidade e a segurança da terapia génica em humanos [21].

Dados os resultados positivos obtidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou, pela primeira vez, em 1990, um ensaio clínico em duas doentes com ADA-SCID. As doentes em questão foram tratadas com linfócitos T modificados, *ex vivo*, para expressar uma cópia funcional do gene que codifica para a enzima adenosina deaminase (ADA, do inglês *adenosine deaminase*), (recorrendo ao uso de vectores retrovirais gamma). Uma das doentes obteve uma resposta temporária a este tratamento, mas os resultados não foram completamente conclusivos. No entanto, este e diversos outros estudos permitiram comprovar que vários tipos de células associadas a doenças de carácter genético eram sensíveis à modificação genética e que os transgenes introduzidos podiam ser expressados de forma estável [2], [7], [18].

Apesar do desenvolvimento e resultados promissores, a morte de Jesse Gelsinger, um jovem de 18 anos, em 1999, que participava num ensaio clínico na Universidade da Pensilvânia, contribuiu para o atraso na terapia génica. Gelsinger sofria de uma deficiência parcial de ornitina transcarbamilase (OTC, do inglês *Ornithine*

Transcarbamylase Deficiency), uma enzima pertencente ao ciclo da ureia, responsável pela remoção de azoto do organismo. Após a injeção do gene *OTC*, através de um adenovírus, sofreu uma falência múltipla de órgãos e acabou por falecer, tornando-se o primeiro doente cuja morte estaria associada ao vector viral usado para o tratamento. Além disso, o desenvolvimento de leucemia em crianças a ser tratadas para a *SCID-X1*, após a integração de um vector retroviral, próxima do promotor do proto-oncogene *LMO2*, levando à transcrição e expressão excessiva do mesmo, colocou também em causa a relação benefício-risco associada à utilização da terapia génica. Após estes acontecimentos, intensificou-se o estudo sobre a integração de vectores retrovirais, de forma a melhorar o perfil de segurança dos mesmos [7], [8], [22].

O número de ensaios clínicos aprovados deste então aumentou exponencialmente, com cerca de 117 ensaios clínicos aprovados só em 1999, no entanto, com os efeitos indesejáveis referidos, foram então diminuindo e, em 2003, este número rondava cerca de 85 ensaios. Todavia, desde 2010-2011 o número de ensaios clínicos em terapia génica tem aumentado, com cerca de 232 ensaios clínicos aprovados só em 2018, como demonstra a evolução na **Figura 1.1**. A maioria dos ensaios clínicos nesta área têm sido desenvolvidos nos Estados Unidos da América (EUA) (cerca de 67%) enquanto, no continente europeu se desenvolvem cerca de 27% dos ensaios [7], [8], [13].

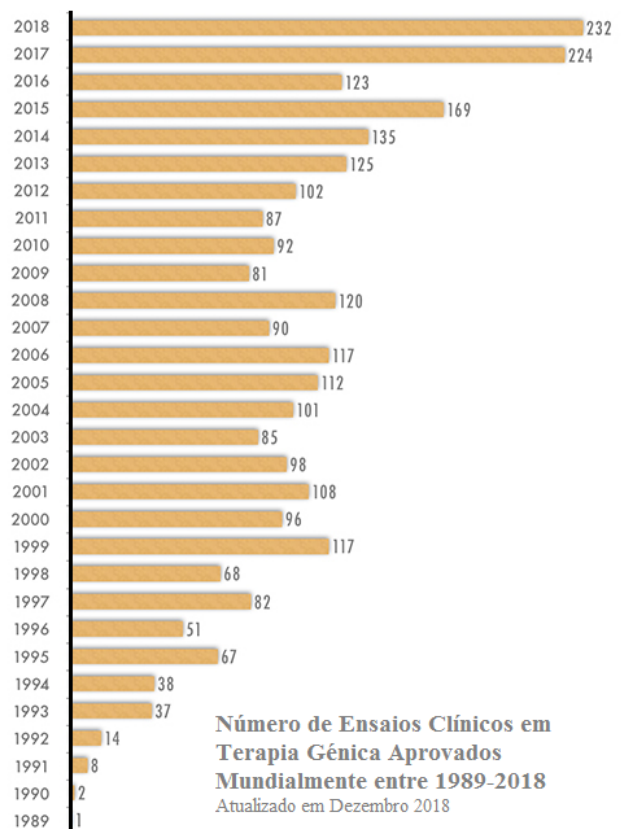


Figura 1.1- Gráfico representativo dos ensaios clínicos em terapia génica aprovados até Dezembro de 2018. Cerca de 144 ensaios foram aprovados em datas desconhecidas, não sendo contabilizados nesta imagem. Adaptado de Journal of Gene Medicine, “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide”, 2018. [Online]. Available: <http://www.abedia.com/wiley/years.php>. [Accessed: 01-Sep-2019].

A China foi o primeiro país a aprovar uma terapêutica com base na terapia génica, através da *China Food and Drug Administration* (CFDA), em 2003: Gendicine, que consiste num vector adenoviral, no qual o gene viral E1 é substituído por ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) do gene *p53 wild-type* (gene supressor de tumor); indicado para o tratamento do carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço. Com recurso a um método de entrega minimamente invasivo, o gene é ativado pelo stress celular e intervém na reparação do DNA ou induz a apoptose. A 19 de Julho de 2012, a EMA concedeu a primeira autorização de introdução no mercado (AIM) para um produto com base na terapia génica, Glybera, composto por um vector adenoassociado que expressa a lípase proteica, para o tratamento da deficiência de lípase proteica. No entanto, este medicamento foi retirado do mercado em 2017 por apresentar pouca evidência de persistência dos benefícios clínicos. Atualmente, são vários os produtos de terapia génica aprovados na Europa e nos EUA para diversas condições clínicas [23]–[25].

2. Metodologias de Administração

A via de administração para a entrega do material genético é uma das etapas mais importantes para o sucesso da terapia génica. As técnicas através das quais o agente terapêutico atinge o alvo pretendido, *ex vivo* e *in vivo*, são executadas de acordo com o mais adequado para cada terapêutica, sendo que esta adequação encontra-se em constante investigação. Dependendo da especificidade do alvo selecionado, a entrega dos genes deve apresentar a maior exatidão possível para exercer o efeito terapêutico esperado e evitar atingir estruturas orgânicas que não sejam um alvo terapêutico e possíveis efeitos adversos consequentes. Com base nos ensaios clínicos existentes atualmente, não é possível afirmar que uma metodologia de administração tem maior sucesso clínico comparativamente a outra, mas que devem ser realizadas, tendo em conta as vantagens e desvantagens de cada, bem como a condição médica em causa [26], [27].

2.1. Sistemas de Terapia Génica *Ex Vivo*

Uma metodologia *ex vivo* baseia-se na modificação de células do indivíduo sujeito ao tratamento, fora do organismo, para posterior transplantação. O seu processo engloba a colheita das células, a alteração e introdução do gene através de um vector, seguida de expansão *in vitro*, resultando em células que expressam o transgene, que são depois reintroduzidas no organismo (**Figura 2.1**) [27], [28].

A ocorrência de menos efeitos colaterais comparativamente a outros métodos, nos primeiros protocolos clínicos realizados, devido a uma resposta imune minimizada pela expansão da linhagem alogénica anteriormente referida e a capacidade de avaliar a eficiência da transdução, bem como a possível manipulação antes da introdução dos genes de interesse no organismo humano são algumas das vantagens associadas aos sistemas *ex vivo*. Além disso, a viabilidade, segurança e alta eficácia do processo, o facto de não existir exposição direta do doente ao vector e um menor risco de alcançar a linhagem germinativa são outros aspetos positivos desta via de entrega. No entanto, está limitada a células mitóticas, sendo esta uma das principais desvantagens deste sistema [26], [29].

Esta técnica foi usada com hepatócitos e células da retina mas, mais frequentemente em terapêuticas que têm por base células estaminais hematopoiéticas (HSC, do inglês *Hematopoietic Stem Cells*) e linfócitos T, por exemplo, uma vez que, são células pluripotentes, isoladas a partir de tecidos como a medula óssea e sangue periférico. A sua capacidade de diferenciação, facilita a expansão e conseqüentemente os autotransplantes, diminuindo assim o risco de rejeição do enxerto e a necessidade de imunossupressão [28], [30].

Foram relatados diversos casos de sucesso em ensaios clínicos associados a esta metodologia como, por exemplo, na ADA-SCID, descrita no capítulo anterior. Após a recolha de células CD34+, da medula óssea do doente, e modificação das mesmas com recurso a um vector retroviral contendo o gene *ADA*, obteve-se um efeito terapêutico temporário e sem efeitos adversos reconhecidos. Outro caso similar realizou-se em ensaios clínicos associados à SCID-X1, que também envolve a extração de células CD34+ e respetivos precursores hematopoiéticos, posteriormente alterados por um retrovírus, derivado do MVL. O resultado verificado consistiu no aumento da proliferação de linfócitos T e linfócitos NK (do inglês *Natural Killer Cell*) [26].

Algumas terapêuticas atualmente aprovadas nesta área têm por base esta via de entrega como o Kymriah, para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda de células B refratária que usa as células T do próprio indivíduo, modificadas *ex vivo*, para a inserção de um recetor antigénico quimérico anti-CD19, ficando com maior capacidade para alcançar células cancerígenas que expressem CD19. Outro exemplo, aprovado pela EMA, Zalmoxis, com indicação para doentes que tenham recebido transplantes de células estaminais, em caso de patologias hematológicas. Os linfócitos T alogénicos são modificados com recurso a um vector retroviral, que codifica para o recetor do fator de crescimento do nervo de baixa afinidade (Δ LNGFR, do inglês *low-affinity nerve growth factor receptor*), de forma a auxiliar a restaurar o sistema imunitário após transplantes [31]–[33].

O efeito da terapia génica não consiste apenas na reversão da doença, mas também na melhoria de uma função, por exemplo, cognitiva, como no caso da Doença de Alzheimer (AD, do inglês *Alzheimer's Disease*). Uma das características fisiopatológicas da AD é a degeneração de neurónios colinérgicos devido à síntese reduzida de acetilcolina. O factor de crescimento associado aos neurónios (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*),

administrado *ex vivo*, mostrou alguns dados relativamente à prevenção da morte neuronal e estimulação da função celular. Esta administração foi realizada através da modificação de fibroblastos do doente, com recurso a um vector viral, de forma a codificarem para o NGF, o que resultou numa melhoria na taxa de declínio cognitivo [26], [34], [35].

2.2. Sistemas de Terapia Génica *In Vivo*

Uma administração *in vivo* do material genético envolve a introdução do transgene, com recurso a um vector (viral ou não viral), diretamente na célula, tecido ou órgão alvo (**Figura 2.1**). Neste caso, a modificação das células ocorre no interior do organismo do indivíduo. Este sistema de entrega é mais utilizado em patologias cujo alvo seja a pele, o fígado, o pulmão e também células sanguíneas. Os sistemas de entregas escolhidos, para as metodologias *in vivo*, devem ser de reduzidas dimensões, quer em termos de tamanho do ácido nucleico, quer do próprio vector de entrega [28].

Apesar de ter capacidade de produzir benefícios clínicos consideráveis, uma das desvantagens desta metodologia é que requer uma entrega altamente direcionada, para que apenas se atinjam os tecidos pretendidos, evitando a difusão dos vectores ao longo do organismo. Se a eficácia de entrega não for conseguida, pode gerar uma resposta imunológica, com risco acrescido para os doentes. O sucesso desta estratégia depende também da permeabilidade do gene terapêutico para as células-alvo, da degradação e estabilidade química intracelular do gene, da dificuldade de transportar moléculas grandes e negativamente carregadas, como o DNA para o núcleo, a sua integração pelo mesmo e da capacidade de expressão do transgene [26], [28], [36].

A técnica de entrega *in vivo* foi inicialmente utilizada em patologias associadas à perda de uma função específica ou mutação, na qual o gene de interesse iria substituir o ausente. Um exemplo bem-sucedido, aprovado pela FDA e que se encontra em estudo pela EMA, é a indução da expressão do gene de sobrevivência do neurónio motor 1 (SMN, do inglês *Survival Motor Neuron 1*), recorrendo a um vector adenoassociado para a atrofia muscular espinhal (SMA, do inglês *Spinal Muscular Atrophy*), uma patologia de etiologia genética que afecta a parte do sistema nervoso associada ao controlo dos movimentos musculares voluntários. A injeção intravenosa de uma dose aumentou a sobrevivência e melhorou a função motora [30], [37]–[39].

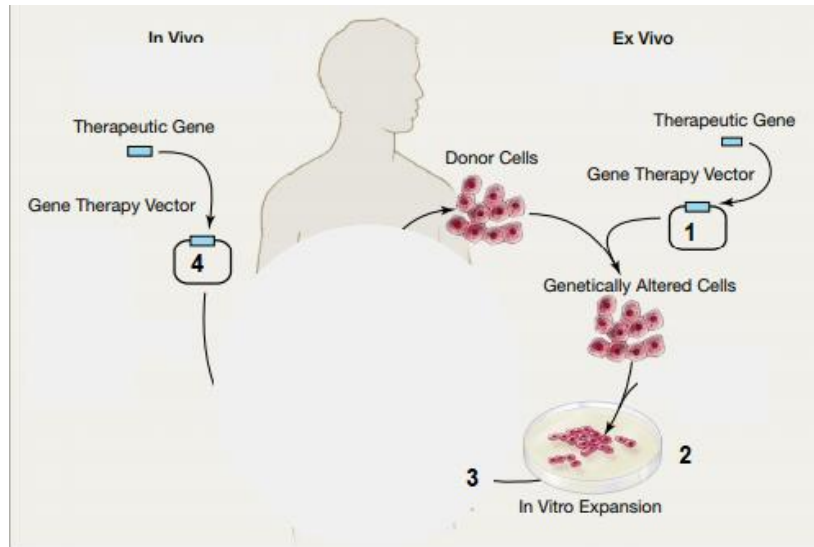


Figura 2.1 – Vias de administração na terapia génica. Na estratégia *ex vivo*: recolha das células do doente (1), modificação das células com recurso a um vector com transgene (2) e expansão *in vitro* (3) para posterior administração (4). *In vivo*: Formulação do transgene no vector adequado e injeção direta nas células alvo do doente. Adaptado de E. H. Kaji and J. M. Leiden, “Gene and stem cell therapies,” J. Am. Med. Assoc., vol. 285, no. 5, pp. 545–550, Feb. 2001.

2.2.1. Entrega Sistémica

A entrega sistémica, como o próprio nome indica, consiste numa via que atinge a circulação sanguínea sistémica. Engloba, por exemplo, a administração intravenosa, intra-arterial e transnasal que permitem a introdução do agente terapêutico diretamente na corrente sanguínea, evitando o efeito de primeira passagem do fígado e que quando comparadas com, por exemplo, a entrega *in situ*, são consideradas minimamente invasivas. A injeção intravenosa em casos de fibrose cística, no endotélio pulmonar, tem sido um dos métodos investigados de entrega sistémica, no entanto, apesar de se ter demonstrado 37% de entrega, a maior parte do agente terapêutico foi detectado no fígado [40].

Por sua vez, a via transnasal diferencia-se das referidas devido ao facto de não ser necessária a produção de formas estéreis, dado que os agentes terapêuticos são rapidamente absorvidos pela mucosa nasal. Esta via é utilizada principalmente ao nível de terapêuticas cujo alvo seja o cérebro, devido ao acesso direto desde a cavidade nasal até ao sistema nervoso central (CNS, do inglês *central nervous system*). Apesar de apresentar algumas limitações, como por exemplo, o dano da mucosa nasal devido ao uso frequente, uma rápida depuração devido ao sistema mucociliar, interferência na absorção

devido a alguma congestão nasal, demonstra uma melhor adesão à terapêutica por parte dos doentes, comparativamente aos outros métodos de entrega [41], [42].

2.2.2. Entrega Local ou *In situ*

Este tipo de entrega é realizado diretamente no local de interesse e engloba a administração intracerebral, intraventricular e intratecal, por exemplo, em caso de entregas ao CNS [43].

Exemplos existentes incluem injeções musculares, que permitem administrações repetidas e maior efeito terapêutico para o tratamento da doença arterial periférica, incluindo a isquémia crónica dos membros inferiores como, por exemplo, o Neovasculagen, desenvolvido em 2011, na Rússia, que consiste num vector plasmídeo de DNA que codifica para o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) 165, simulando o crescimento de vasos sanguíneos, tentando contrariar a perda de fluxo sanguíneo na zona afetada [44].

3. Vectores de Entrega

A entrega de ácidos nucleicos isolados ao núcleo da célula está associada a dificuldades na passagem da membrana plásmática para o núcleo, devido ao tamanho e carga negativa da molécula de DNA e à degradação mediada por nucleases, limitando o seu tempo de meio vida e, conseqüentemente, a eficácia da terapêutica. Desta forma, tornou-se necessário desenvolver um sistema que possibilite a entrega eficiente dos transgenes. Os genes terapêuticos a serem entregues no organismo do doente são transportados com recurso a veículos denominados vectores. Estes vectores têm como principais objetivos facilitar a entrega dos transgenes, protegendo os ácidos nucleicos da degradação referida, promover a internalização celular e auxiliar a integração no núcleo [36], [45], [46].

Um sistema de entrega de genes ideal deveria preencher diversos critérios como, (i) não desencadear resposta imunitária, (ii) exibir um perfil de segurança elevado, permitindo a administração sem a ocorrência de efeitos adversos citotóxicos, (iii) ter capacidade de transportar ácidos nucleicos independentemente do seu tamanho, (iv) permitir a entrega específica independentemente da localização das células alvo, (v) possuir a capacidade de infetar células mitóticas e não mitóticas, (vi) permitir uma expressão regulada e sustentada dos genes que transporta, (vii) permitir que o transgene permaneça em posição episomal ou que integre numa região específica do genoma e não aleatoriamente e, por fim, (viii) possuir a capacidade de produção em larga escala, a um preço relativamente económico [36].

De uma forma geral, podem considerar-se dois sistemas principais de entrega de genes os sistemas não virais e os sistemas virais. A maioria dos ensaios clínicos aprovados com terapia génica envolvem o uso de vectores virais (**Figura 3.1**), no entanto, diversos progressos observados no desenvolvimento e na utilização de vectores não virais evidenciam a sua importância para o transporte de genes em terapia génica. A escolha do sistema a ser utilizado é feita de acordo com a patologia, a célula ou tecido-alvo, o tamanho e o tipo de gene de interesse, para além do tempo e dos níveis de expressão que se deseja obter [45], [47].

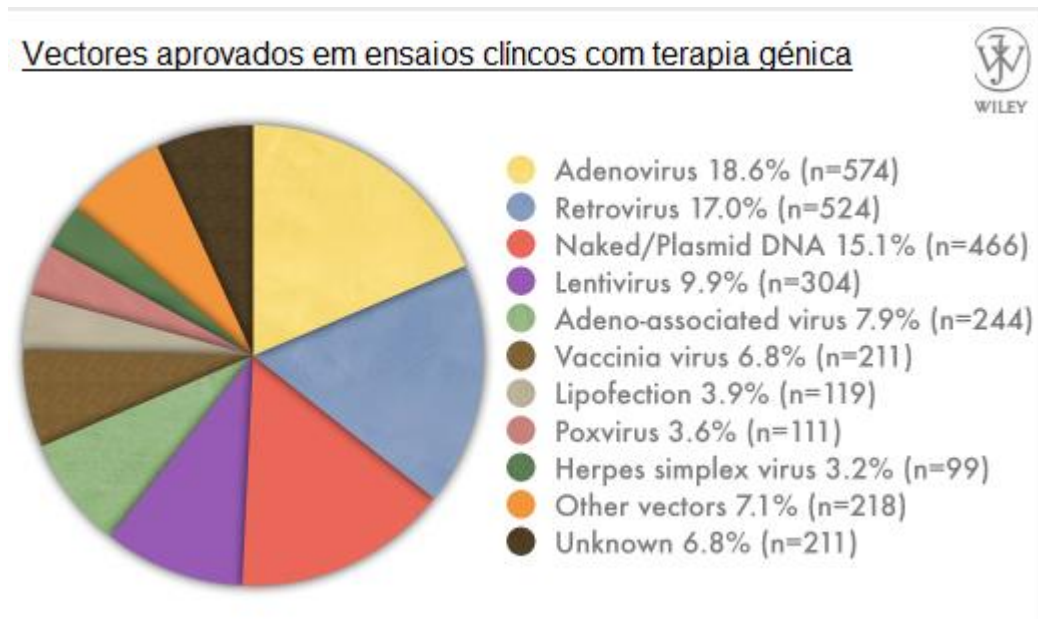


Figura 3.1- Vectores utilizados em ensaios clínicos com terapia génica por número e percentagem – dados atualizados em Setembro de 2019. Adaptado de “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide- Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials,” J. Gene Med., Sep. 2019.

3.1. Sistemas de Entrega Não-Virais

Os sistemas não-virais englobam abordagens físicas, nas quais o transgene é introduzido nas células de forma mecânica, normalmente através da disrupção temporária da membrana celular e abordagens químicas, nas quais componentes orgânicos como lipossomas ou polímeros são complexados com os genes terapêuticos, de forma a facilitar a sua entrada nas células [45], [48].

Algumas das vantagens associadas a estes sistemas de entrega englobam o facto de serem considerados sistemas de alta reprodutibilidade, com a possibilidade de produção em larga escala e com custo razoável. Têm ainda uma elevada capacidade de carga, permitindo a entrega de transgenes de grande tamanho, como, por exemplo, fragmentos de DNA genómico completos, incluindo elementos de regulação e sequências intrónicas. Comparativamente aos sistemas virais, estão associados a menor risco de respostas imunológicas bem como menor risco de mutagénese por inserção, apresentando assim e de uma forma geral, um perfil de segurança mais elevado [45], [48].

No entanto, a baixa eficácia de transdução e baixa especificidade, que dependem dos grupos funcionais ligados aos complexos de entrega, são desvantagens destes sistemas, que implicam complexas modificações na sua estrutura, de forma a conseguir um vector de entrega estável e eficiente [45].

As limitações principais envolvem ainda a integridade extracelular e a internalização no núcleo. Aquando da administração do vector na corrente sanguínea, este deve ter a capacidade de manter a integridade de forma a atingir a célula-alvo, de interagir com o recetor das células-alvo e de escapar à degradação pelos endossomas. Para além disso, de forma a atingir o espaço intracelular devem diminuir a interação com proteínas plasmáticas [36], [45].

3.1.1. Sistemas Não-Virais Físicos

Alguns exemplos de métodos de entrega físicos são a injeção direta com recurso a uma agulha, a entrega hidrodinâmica, electroporação, ultrassons, *gene gun* e transfeção magnética. As principais vantagens e desvantagens de cada método estão descritas na **Tabela I**. De forma geral, atuam alterando a permeabilidade e penetrando temporariamente nos poros da membrana celular, por energia mecânica, eléctrica ou ultra-sónica. São principalmente utilizados para a introdução de plasmídeos e dos elementos de regulação para a expressão dos mesmos em células, sem recorrer a um transportador [36], [49], [50].

A injeção directa, um dos métodos mais antigos e com menor utilização na investigação e em ensaios clínicos, consiste na introdução de uma pequena quantidade de DNA plasmidial, com cerca de 2-19 quilo pares de bases (kbp, do inglês *kilo base pairs*) diretamente nas células ou no núcleo das células-alvo. Apesar da facilidade de aplicação e simplicidade, comparativamente aos restantes métodos de entrega, é uma técnica cujo sucesso é limitado devido ao número de células reduzido onde se consegue realizar a transformação, que está restrito ao local da injeção. Além disso, é uma técnica que está limitada a locais de injeção onde exista pouca concentração de endonucleases como, por exemplo, tecido muscular e o cérebro. Estudos recentes demonstram que, apesar de se encontrar em desuso, existem estudos que mostram resultados positivos associados a este método de entrega. A destruição de células de Langerhans, em doentes com Diabetes *Mellitus* do tipo 1 e a necessidade de injeções recorrentes de insulina, conduziu à

avaliação da expressão génica, através da injeção direta intraductal de DNA plasmídeo (pDNA, do inglês *plasmid DNA*) *in vivo*, no pâncreas. Foi possível concluir que, este método de entrega está associado a níveis de expressão do transgene elevados no pâncreas, embora tenham sido observadas lesões transitórias. A injeção directa também foi estudada em modelos animais com isquemia crónica do miocárdio, nos quais se procedeu à injeção intramiocardial de pDNA com fatores de crescimento, como o VEGF, por exemplo. Os resultados obtidos demonstram a expressão destes fatores, 3 meses após a entrega, apesar de estar limitada a melhorias funcionais na contração em repouso [51]–[53].

A entrega hidrodinâmica, consiste na injeção intravenosa de um grande volume de solução salina com DNA a alta pressão nos vasos sanguíneos. As condições necessárias para a entrega de genes, correspondem, em murganhos, a um volume de injeção de cerca de 8%-10% do peso corporal e durante aproximadamente 5 segundos. Este método tem sido principalmente estudado na entrega de ácidos nucleicos ao fígado, devido à sua relação com diversas doenças hereditárias, por ser responsável por várias vias metabólicas. Veja-se, por exemplo, a injeção hidrodinâmica de plasmídeos que expressam trombopoietina, para o tratamento do carcinoma hepatocelular, que resultou num aumento transitório da contagem de plaquetas, principalmente em modelos animais. No entanto, em humanos, devido às alterações morfológicas na membrana celular e ao volume de injeção necessário, esta técnica ainda não é viável e portanto, até agora foi apenas utilizada em modelos animais [45], [50], [54].

Por sua vez, a electroporação, utilizada pela primeira vez em 1982, consiste na aplicação de pulsos elétricos alternados (desestabilização temporária pela inserção de um par de eléctrodos) nas membranas celulares para aumentar a permeabilidade das mesmas e, desta forma facilitar a passagem das moléculas de DNA. Esta penetração é possível pela formação de poros temporários na superfície da membrana celular, devido à bicamada lipídica que, quando sujeita a um potencial eléctrico, reorienta-se de forma a formar poros hidrofílicos. Esta técnica tem mostrado resultados em vários tipos de tecidos, desde que seja possível a colocação dos eléctrodos, como por exemplo, no tecido muscular, na distrofia muscular de Duchenne (DMD, do inglês *Duchenne muscular dystrophy*). A transferência do gene que expressa a distrofina, em modelos animais, mostrou uma elevada eficiência de transfecção, bem como um nível elevado da expressão génica ao longo do tempo (superior a 10 semanas). A eficácia deste método está relacionada com a duração do pulso eléctrico, a intensidade do campo e geometria do eléctrodo. No entanto,

o seu uso *in vivo* ainda é limitado devido ao facto de ser necessário uma cirurgia para a colocação do eléctrodo nos órgãos, portanto é difícil transfetar células numa grande área, pois existe uma distância de cerca de 1 cm entre os eléctrodos, e a técnica pode ainda conduzir a danos irreversíveis nas células devido à alta voltagem aplicada [36], [49], [55]–[58].

A transferência de genes mediada por ultrassom ou, sonoporação é um método que utiliza frequências ultrassónicas para produzir poros nanométricos na membrana celular, aumentando assim também a permeabilidade da mesma. É um método seguro e não invasivo, que foi melhorado pelo uso de agentes de contraste (inicialmente usados para permitir visualizar o contraste do som em imagens), ou seja, microesferas com gás, que quando injetadas sistemicamente possuem a capacidade de expandir em resposta às ondas de ultrassom, podendo aumentar a permeabilidade das membranas a determinados agentes terapêuticos. Esta técnica tem sido principalmente estudada para locais-alvo com difícil acessibilidade, como doenças oculares e do CNS [49], [59], [60].

O *gene gun*, também designado como bombardeamento de partículas de DNA revestidas, é outro método físico, no qual microesferas de ouro, tungsténio ou prata, com 1-1.5 μm de diâmetro cobertas com DNA são aceleradas por um gás pressurizado, projectando-as, a alta velocidade, contra as células-alvo, promovendo, desta forma, a entrada do DNA nas células. A eficiência deste método depende do tamanho das partículas usadas como transportadores de DNA, a pressão do gás usado e a concentração do transgene utilizado. Apesar de ser um sistema com diversas vantagens como proporcionar um elevado nível de expressão após pouco tempo de exposição (aproximadamente 3 horas) e longa duração da mesma, a sua eficiência é limitada quando se pretende transferir um transgene para um tecido completo, devido à baixa penetração das partículas metálicas. Foram também relatados danos celulares, maioritariamente devido à colisão das partículas revestidas com as células, que dependem, em grande parte, do tamanho das microesferas e da pressão do gás utilizado. Não obstante, a introdução de um gene que expressa a distrofina, num modelo animal de DMD, mostrou níveis relevantes da proteína, até cerca de 60 dias após o bombardeamento, mas sem integração no genoma [36], [49], [61], [62].

A transfeção magnética recorre a um campo magnético para introduzir os ácidos nucleicos nas células, através de nanopartículas de óxido de ferro, revestidas com lípidos,

polímeros catiónicos (ambos com capacidade para complexar com o DNA, por interação eletroestática) e com vectores virais. Apesar da captação das partículas se realizar maioritariamente por endocitose, a força magnética permite uma rápida e elevada concentração do vector nas células-alvo, para além de diminuir a toxicidade da transfeção devido à rápida cinética e minimizando também os efeitos adversos por aumentar a precisão relativamente às células-alvo, dado que o campo magnético permite diminuir a difusão do vector. O transporte de plasmídeos que codificam para o VEGF, de forma a promover a angiogénese, em murganhos, demonstrou um aumento da concentração da proteína no tecido-alvo, comparativamente a áreas não sujeitas a um campo magnético, aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a necrose associada [50], [51], [63]–[65].

Apesar de consistirem em métodos simples e regra geral, seguros, as desvantagens associadas aos modelos de entrega físicos envolvem a falta de protecção contra as nucleases, a baixa eficiência na entrega de genes, níveis de expressão do transgene reduzidos, em comparação com outros métodos de transfeção, e ainda uma reduzida aplicação *in vivo* [66].

3.1.2. Sistemas Não-Virais Químicos

Os sistemas de entrega de genes terapêuticos químicos compreendem duas categorias principais sistemas de base polimérica e sistemas de base lipídica. As principais vantagens e desvantagens de cada método podem ser observadas na **Tabela I**. Os métodos químicos são mais comumente utilizados que os métodos físicos. Os principais sistemas químicos incluem a formação de um complexo do DNA com lipossomas catiónicos- sistemas de base lipídica, ou com polímeros catiónicos- sistemas de base polimérica, facilitando assim a passagem pela membrana celular. Ao possuírem carga total positiva, os compostos utilizados permitem a interacção com as cargas negativas do grupo fosfato do DNA e minimizando a repulsão de cargas entre o DNA e os domínios extracelulares das proteínas de membrana, também com carga negativa, facilitando a entrada na célula [47]–[49].

Dentro dos sistemas de base lipídica, os lipossomas catiónicos, também designados por lipossomas convencionais, possuem um grupo hidrofóbico, constituído por cadeias alquílicas de carbono (tamanho variável entre 12 a 18 átomos de carbono) ou colesterol, que asseguram que os lipossomas se dispersem em bicamadas, na presença de

um meio aquoso, protegendo a parte aquosa e expondo o grupo amina. O grupo amina é a parte essencial para a ligação ao DNA, interagindo eletrostaticamente com o mesmo, e condensando a molécula transportadora em unidades pequenas- os lipoplexos. A estrutura de um lipossoma catiónico, baseada no DOTMA, está representada na **Figura 3.2**. A formação destes complexos protege os ácidos nucleicos da degradação por nucleases e facilita a endocitose. Foi demonstrado que o aumento dos grupos amina, que podem ser monovalentes ou polivalentes, o aumento da distância entre estes (pelo aumento do grupo de ligação) e os grupos hidrofóbicos e ainda a presença de estruturas com conformação em T (não lineares) são vantajosos para a entrega dos genes, uma vez que aumenta o local de contacto com o DNA e consequente condensação e proteção dos ácidos nucleicos. No entanto, o aumento progressivo de cargas positivas pode resultar numa ligação cuja posterior dissociação seja difícil ou até à formação de complexos mais instáveis e tóxicos, devido à formação de micelas. A eficácia da transdução, quando associada ao tamanho do lipoplexo, demonstra uma diminuição com o aumento de tamanho da cadeia alquílica. Alguns exemplos de sistemas de base lípidica podem ser observados na **Figura 3.3**, como o DOTMA e o DOSPA. A maior parte das vezes, estas moléculas anfipáticas são também constituídas por um “lípidio auxiliar”, como o DOPE (**Figura 3.3**) ou o colesterol, que auxiliam a destabilização da membrana celular, facilitando a entrada de DNA [45], [46], [67]–[70].

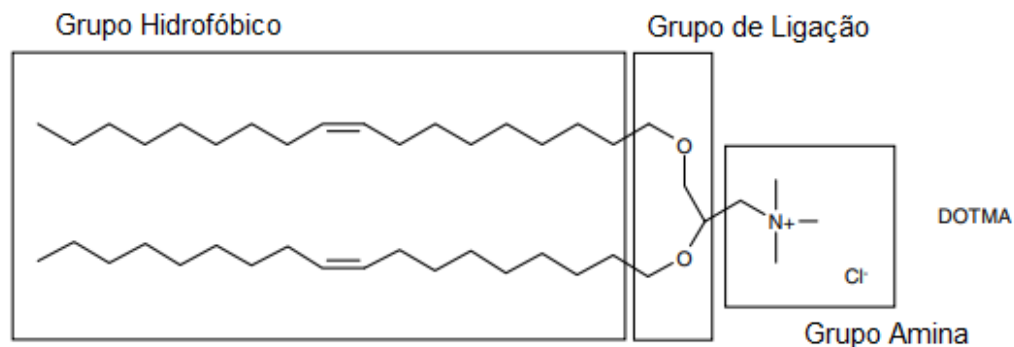


Figura 3.2 – Exemplo da estrutura de um lipídio catiónico, baseada no 2,3-bis[oleyl]oxipropyltrimethylammonium chloride (DOTMA). Podem ser classificados de acordo com a constituição do grupo hidrofóbico, do grupo de ligação (como por exemplo, glicerol) e do grupo amina (monovalente ou polivalente). Adaptado de S. Simões et al., “Cationic liposomes for gene delivery,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 2, no. 2. *Expert Opin Drug Deliv*, pp. 237–254, Mar-2005.

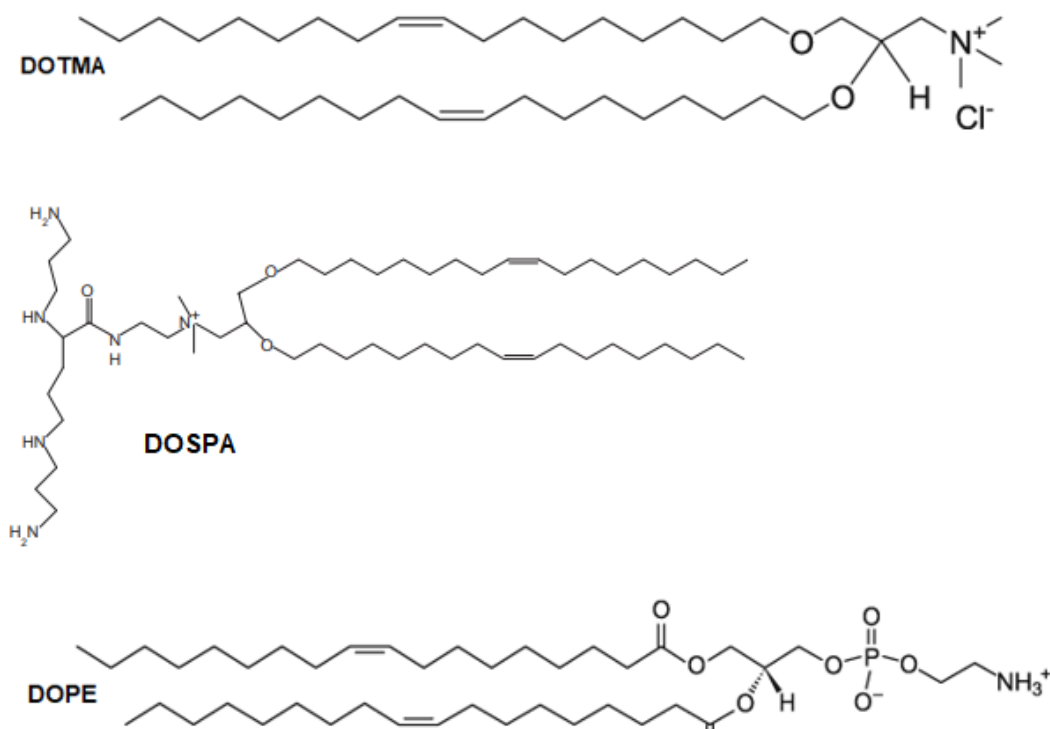


Figura 3.3 – Exemplos de lipossomas catiónicos: DOTMA, cujo grupo amina é monovalente; DOSPA, com grupo amina polivalente e DOPE, normalmente usado como lípido auxiliar. Adaptado de “DOTMA | Avanti Polar Lipids.” [Online]. Available: <https://avantilipids.com/product/890898>. [Accessed: 10-Mar-2020], S. H. Pun and A. S. Hoffman, “Nucleic Acid Delivery,” in Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition, Elsevier Inc., 2013, pp. 1047–1054 e “18:1 (Δ 9-Cis) PE (DOPE) | Avanti Polar Lipids.” [Online]. Available: <https://avantilipids.com/product/850725>. [Accessed: 10-Mar-2020]

No entanto, a administração sistêmica de complexos de entrega de DNA baseados em lipossomas mostra uma distribuição não específica, alcançando diferentes órgãos, o que contrasta com o pretendido na terapia gênica, ou seja, uma transfeção direcionada. Outro problema associado a estes vectores é a sua interação não específica e o baixo tempo de semi-vida na corrente sanguínea. Uma solução recente para este problema é a PEGuilação dos vectores (modificação da superfície dos lipossomas com polímeros hidrofílicos), que diminui a agregação e aumenta o seu tempo de circulação. Em modelos *in vivo*, com o aumento do conteúdo sérico, verificou-se também uma diminuição da eficiência de transdução, devido à ligação dos lipoplexos com os componentes sanguíneos. Estes sistemas têm como vantagens o facto de serem biodegradáveis, biocompatíveis e de uma forma geral, pouco tóxicos, uma vez que, são constituídos por substâncias naturalmente presentes no organismo humano, para além de demonstrarem uma encapsulação estável, uma baixa imonogenicidade e custo de fabrico relativamente

acessível comparativamente a outros métodos de entrega. A capacidade de sintetizar uma grande variedade de lípidos resultou num sistema altamente adaptável e flexível. A síntese de nano-partículas, como sistemas de entrega de base lípidica com baixa imunotoxicidade e peso molecular facilmente ajustável, pode surgir como uma oportunidade para o desenvolvimento de lipoplexos com maior eficácia terapêutica [45], [50], [69], [71], [72].

Por outro lado, relativamente aos sistemas de entrega de base polimérica, os polímeros catiónicos, tal como nos sistemas de base lípidica, formam um complexo com o DNA, formando um poliplexo. O complexo formado é caracterizado por ter um tamanho pequeno e ser capaz de prevenir a degradação do DNA, aquando da endocitose. A polietilenoimina (PEI, do inglês *Polyethylenimine*) é um polímero com uma boa eficiência de transfeção, dado que possui capacidade para condensar o DNA (devido ao seu potencial de cargas catiónicas) e oferecer proteção contra as nucleases, pela formação de uma nano partícula esférica. Uma limitação muito importante dos sistemas não virais químicos é poderem ser conduzidos ao endossoma aquando a sua entrada na célula, conduzindo à sua degradação e do transgene e conseqüente perda de eficácia terapêutica. Os polímeros possuem uma vantagem que permite ultrapassar esse problema, uma vez que, os grupos amina, aquando da localização do complexo no interior dos endossomas, podem atuar como aceitador de prótons, resultando na desintegração destes e impedindo a sua posterior degradação lisossomal. De uma forma geral, estes sistemas estão associados a um baixo perfil de toxicidade crónica ou aguda, sendo que comprimentos superiores (25 kDa) estão associados, ainda que reduzida, a maior toxicidade. Os poliplexos são bastante versáteis, podendo ser projetados para diferentes comprimentos, peso molecular e ramificações (**Figura 3.4**) e também integram facilmente outros grupos funcionais utilizados para melhorar a sua especificidade. A PEI com um menor peso molecular está associada a uma menor eficácia relativamente à transfeção mas que mantém a capacidade de condensar o DNA. Foi ainda demonstrado que é um vector com grande eficácia para fornecer plasmídeos e oligonucleotidos *in vitro* e *in vivo*, sendo que a entrega nuclear com maior eficácia de transfeção demonstrada com recurso a PEI, corresponde a uma estrutura linear com 22 kDa em comparação com uma estrutura ramificada. [45], [67], [71], [73]–[75].

A PLL (Poly-(L)-lysine) é outro polímero catiónico (**Figura 3.4**), de primeira geração, estudado principalmente devido às suas capacidades de biodegradação e à sua natureza não citotóxica. No entanto, não consegue formar complexos estáveis, ligando-

se com facilidade às proteínas plasmáticas e a sua eficiência de transfeção não é muito elevada devido à não existência de grupos amina. O quitosano (**Figura 3.4**) é outro polímero direcionado sobretudo para o transporte de pequenas moléculas de RNA interferência (siRNA, do inglês *small interfering RNA*), que demonstra excelente biocompatibilidade, segurança, baixa toxicidade e que pode ser facilmente modificado para aumentar a eficiência (devido aos seus grupos amina e hidroxilo, que também permitem a condensação do material genético em pH ácido e neutro). Tem sido estudado para a formação de complexos com outros polímeros, como PEI, de forma a torná-los mais biodegradáveis. No entanto, demonstra uma menor eficiência devido à sua baixa solubilidade em água e baixa especificidade, sendo que se estima que, nanopartículas estáveis formam-se com quitosanos de peso molecular entre 49-51 kDa e alto grau de desacetilação. Os dendrímeros são polímeros esféricos e muito ramificados, cuja estrutura básica consiste num grupo amina que se liga ao DNA, comprimindo-o e permitindo a sua internalização pela membrana celular. A poliamidoamina (PAMAM), por exemplo, é um dendrímero modificado (**Figura 3.4**), com compostos fluorescentes, que além de permitirem a monitorização da entrega do gene, demonstrou possuir alta afinidade com siRNA e também elevada eficácia de transfeção. No entanto, a sua elevada toxicidade e alto custo de fabrico tornam a sua aplicabilidade difícil. Uma solução possível para diminuir a citotoxicidade seria a conjugação com espécies reativas de oxigénio [67], [72], [73], [76], [77].

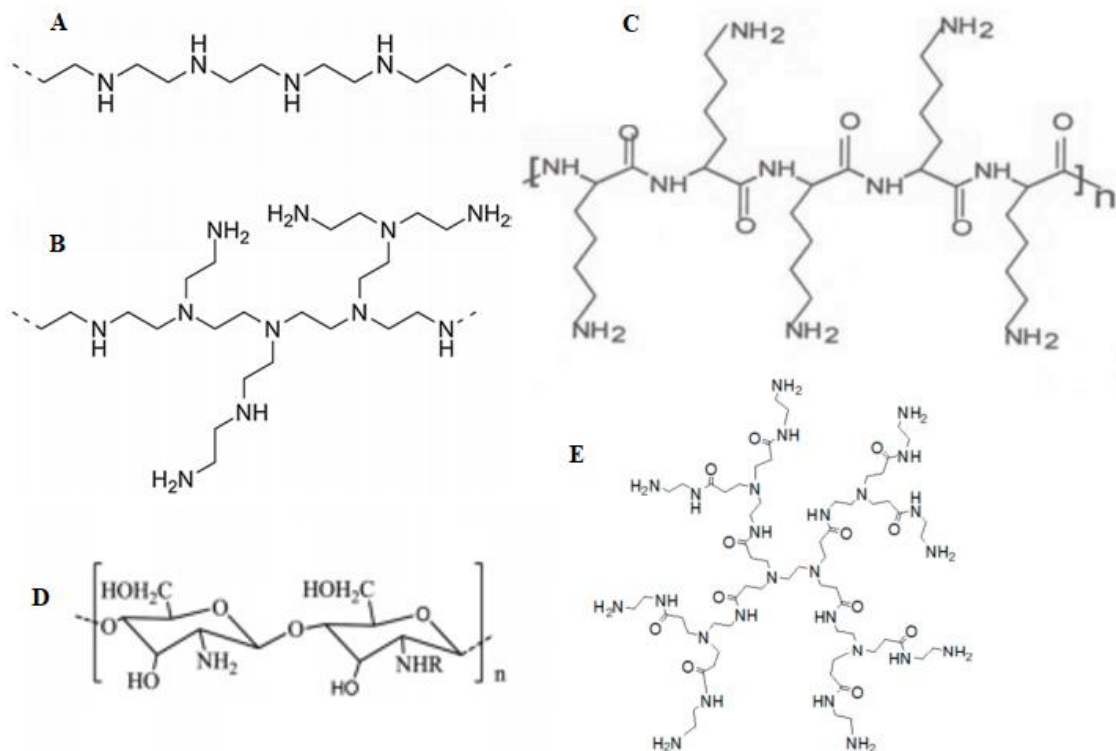


Figura 3.4 - Exemplos de polímeros catiónicos: A estrutura química de um polietilenimina (A) linear e (B) ramificada, (C) PLL de estrutura linear, (D) quitosano e (E) dendrímero PANAM. Adaptado de T. J. Thomas, H. A. Tajmir-Riahi, and C. K. S. Pillai, “Biodegradable polymers for gene delivery,” *Molecules*, vol. 24, no. 20. MDPI AG, p. 3744, 17-Oct-2019, doi: 10.3390/molecules24203744 e S. Patil et al., “The development of functional non-viral vectors for gene delivery,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 21, Nov. 2019, doi: 10.3390/ijms20215491.

A comparação entre os polímeros, principalmente os mais estudados, PEI e PLL, revela, por exemplo, que na entrega de um plasmídeo de 4.2 kbp a células estromais da medula óssea, ambos possuem capacidade equivalente de condensar o DNA e transportá-lo até ao núcleo, mas a eficiência de transfeção e expressão do transgene são mais elevadas, ao usar PEI. A existência de sistemas nos quais o DNA é condensado com polímeros catiónicos e posteriormente revestido com sistemas de base lípídica parece ser o próximo passo no desenvolvimento de sistema de entrega químicos [51], [76].

Entre as vantagens da utilização de lipossomas e polímeros, podemos citar a sua simplicidade, baixa imunogenicidade e, em certos casos, (dependendo da composição do complexo) a capacidade de direcionamento destes vectores para células específicas. No entanto, a utilização *in vivo* ainda é muito limitada pela especificidade reduzida e pela opsonização dos complexos por proteínas plasmáticas, que diminuem muito a eficiência da transfeção [47], [76].

Tabela I- Principais Vantagens e Desvantagens de Sistemas de Entrega Não Virais Físicos e Químicos

Sistema de Entrega		Método de Entrega dos Genes	Vantagens	Desvantagens
Físico	Injeção Direta	Direto	Fácil aplicação	Baixa eficácia (restrição local injeção)
	Injeção Hidrodinâmica	Pressão Hidrodinâmica	Específica; Elevada eficiência	Restrição a modelos animais (elevado volume)
	Electroporação	Pulso Elétrico	Específica; Elevada eficiência	Uso <i>in vivo</i> limitado, risco de danos irreversíveis
	Sonoporação	Frequências Ultrassónicas	Não Invasivo; Específico	Baixa eficiência
	<i>Gene Gun</i>	Pressão elevada	Eficácia	Risco danos celulares, limitação área
	Transfeção Magnética	Campo magnético	Específica; Toxicidade reduzida	Baixa eficiência
Químico	Lipossomas Catiónicos	Interação de cargas	Proteção ácidos nucleicos; Toxicidade reduzida; Fabrico acessível e estável	Não-específico; Baixa eficiência <i>in vivo</i>
	Polímeros Catiónicos	Interação de cargas	Proteção ácidos nucleicos; Toxicidade reduzida, Fácilmente modificáveis;	Baixa eficiência <i>in vivo</i>

3.2. Sistemas de Entrega Virais

Os vírus são considerados boas ferramentas para a transferência de material genético, uma vez que estão associados, naturalmente, a uma elevada taxa de infeção e transdução em células humanas, aumentando assim a eficácia de entrega de genes, comparativamente aos sistemas não-virais. No entanto, na maioria dos casos, por serem agentes patogénicos, é necessário a sua modificação para uso clínico, de modo a que o seu perfil de segurança aumente e não condicione o sucesso de uma terapia. Os primeiros ensaios clínicos realizados com recurso a vectores virais, foram essencialmente projetados, para testar a segurança e viabilidade dos mesmos, sendo que alguns aspetos negativos que marcam a história da terapia génica estão relacionados com a falta de segurança destes, nomeadamente, devido a risco de toxicidade, resposta imune a antigénios virais ou recombinação viral. Não obstante, os vectores virais são os sistemas de entrega mais utilizados nos estudos para desenvolvimento de protocolos de terapia génica [45], [78].

Uma das características mais interessantes dos vectores virais como veículos de entrega de genes é a sua especificidade, uma vez que de uma forma natural, possuem um tropismo para as células que expressem os seus recetores. No entanto, é importante referir que, os vectores virais a serem utilizados em terapia génica devem ser capazes de transferir o material genético para as células-alvo, sem conseguirem replicar-se e continuar o seu ciclo infeccioso. A incapacidade de replicação é obtida através da deleção de genes virais necessários para a proliferação viral, substituindo-os por genes de interesse terapêutico. Esta estratégia, que de uma forma geral é transversal a quase todos os vectores virais utilizados em terapia génica, aumenta o perfil de segurança dos mesmos, tornando-os mais seguros para a utilização em seres humanos. Em contrapartida, uma desvantagem importante da sua utilização, prende-se com a sua produção em larga escala, que é complexa e dispendiosa [45].

Os vírus mais utilizados na produção de vectores virais para terapia génica englobam os adenovírus, retrovírus e vírus adenoassociados. As características principais de cada classe de vectores virais podem ser observadas na **Tabela II** [47].

3.2.1. Vectores Adenovirais

Os adenovírus (Ad) têm um tamanho de aproximadamente 60-90 nm, sem envelope, de forma icosaédrica, com núcleocapside e com genoma de DNA de cadeia dupla linear de 26 a 45 pares de bases. Têm a capacidade de infectar células em divisão e células que não se encontram em divisão, sem necessidade de integração no genoma hospedeiro, podendo expressar genes sob a forma de um epissoma [79][80].

A primeira geração de vectores adenovirais (**Figura 3.5**) tem como características a deleção da região E1 do genoma viral (responsável pela replicação), sendo a cassete de expressão com o gene terapêutico inserida na região E1. Adicionalmente, para obter uma maior capacidade de transgene, a região E3 também pode ser eliminada. No entanto, estes vectores ainda estavam associados a baixos níveis de expressão e a uma alta resposta imunogénica e, portanto, a sua eficácia e segurança *in vivo* era muito limitada. De forma a tentar ultrapassar esta limitação, a segunda geração de vectores adenovirais foi desenvolvida (**Figura 3.5**), sendo caracterizada por deleções na região E2 ou E4, sem porém resolver as questões de imunogenicidade da primeira geração de vectores. Ambas as gerações recorrem a linhagens celulares produtoras para as funções dos genes removidos. Posteriormente, foram gerados vectores de alta capacidade (**Figura 3.5**), nos quais se removeram todos os genes virais codificantes, possibilitando a introdução de cassetes até 36 kpb (vectores adenovirais *gutless*). Estes vectores retêm apenas as repetições terminais invertidas e o sinal de empacotamento. No entanto, necessita de um vírus auxiliar que forneça proteínas reguladoras e estruturais para a montagem das partículas virais, podendo resultar na contaminação dos vectores terapêuticos pelos vírus auxiliares [45][81].

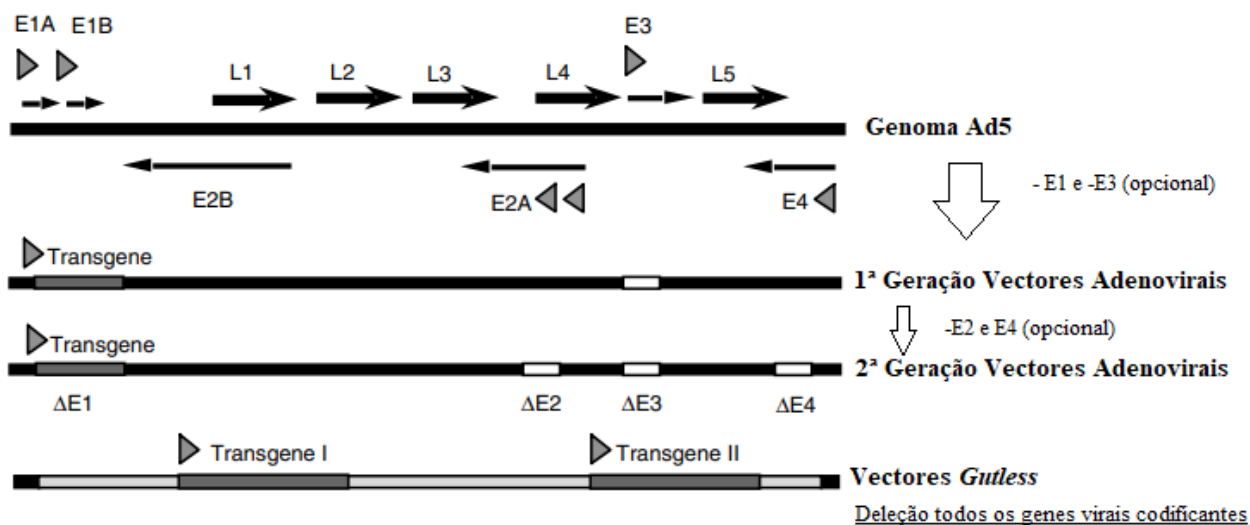


Figura 3.5- Representação esquemática do genoma do serótipo 5 de adenovírus, com promotores, E (early) e L (late) mRNA, e dos vetores virais adenovirais. A 1ª geração de vetores apresenta-se com deleção na região E1 e E3, a 2ª geração com deleção na região E2 e E4 e os vetores gutless, com capacidade para transgenes até 36 kbp. Adaptado de C. Volpers and S. Kochanek, “Adenoviral vectors for gene transfer and therapy,” J. Gene Med., vol. 6, no. S1, pp. S164–S171, Feb. 2004, doi: 10.1002/jgm.496.

O primeiro estudo que relata o sucesso do uso de vetores Ad em humanos, avaliou a capacidade, *in vivo*, da entrega e expressão de cDNA de $\alpha 1$ antitripsina em células hepáticas em doentes com um baixo nível deste fator. Os resultados demonstraram a possibilidade de utilização deste vírus como veículo de entrega de genes [82].

As vantagens associadas a estes vetores incluem a elevada eficiência de transdução, particularmente *in vivo*, elevada capacidade de clonagem do transgene (sobretudo nos vetores *gutless*), capacidade de infetar células mitóticas e não mitóticas, especificidade na entrada das células mediada por recetores de antígeno quimérico de células (CAR, do inglês *Chimeric Antigen Receptor*), baixa patogenicidade, comparativamente a outros vetores virais e um amplo tropismo para células humanas [83].

Por outro lado, a difícil produção, a imunogenicidade apresentada, associada ao facto de a maior parte dos doentes ter anticorpos para os serotipos mais comuns de adenovírus, a expressão génica transiente e a elevada hepatotoxicidade são desvantagens que têm limitado o uso de vetores Ad. Além destas, estes vetores são rapidamente

eliminados pelo sangue, sendo necessárias doses múltiplas para se obter um índice terapêutico adequado [47][84].

Uma das aplicações mais estudadas destes vectores, está relacionada com a possibilidade de atuarem como um agente antitumoral. Os vectores adenovirais, com ou sem transgene, podem ser projetados para se replicarem especificamente em células tumorais, de forma a induzir citotoxicidade ou apoptose, *in situ*. Esta projeção é feita através da expressão de genes supressores de tumores ou genes suicidas, ativados pelo stress celular, formando assim os designados vectores oncolíticos. Veja-se o exemplo do Gendicine, já anteriormente referido (**Capítulo 1.1**). Outro exemplo desta capacidade oncolítica é a entrega, em tumores em crescimento, do gene timidina cinase do vírus herpes simplex do tipo 1 (HSV-tk, do inglês *herpes simplex virus thymidine kinase*), tornando-o sensível ao ganciclovir, por norma não tóxico em células de mamíferos, apresentado resultados como inibição do crescimento do tumor e melhoria da sobrevivência. Estudos mais recentes, demonstram a utilização destes vectores adenovirais oncolíticos na prática clínica como, por exemplo, no cancro do pulmão de não pequenas células (NSCLC, do inglês *non-small-cell lung carcinoma*), o tipo de cancro de pulmão mais prevalente (85%-90% dos casos). O alcalóide alopurine apresenta atividade antiproliferativa em diversos tipos de cancro, mas os mecanismos subjacentes em casos de cancro de pulmão não são bem conhecidos. A administração sinérgica deste alcalóide com o uso de vectores adenovirais que expressam para o gene supressor de tumor *p53*, *in vitro* e *in vivo*, resultou numa forte inibição do crescimento de células NSCLC, dependente da dose, induzindo a apoptose [45], [79], [85]–[87].

3.2.2. Vectores Adeno-Associados

São vectores derivados de vírus adeno-associados (AAV, do inglês *adeno-associated virus*), com cerca de 25 nm, caracterizados por possuírem um genoma linear de DNA, de cadeia simples, de aproximadamente 4.8 kbp e por não possuírem envelope. O genoma viral (**Figura 3.6**) é caracterizado pela presença dos genes *Rep* (Replication) e *Cap* (Capsid), responsáveis pela replicação viral e produção de estruturas proteicas, respetivamente. Na ausência de um vírus auxiliar, tendem a manter-se no hospedeiro sobre a forma de um episoma ou, menos recorrentemente, integrar-se no genoma do hospedeiro, no cromossoma 19. Quando na presença de um vírus auxiliar, como o herpesvírus ou adenovírus, iniciam a replicação do genoma viral e infeção produtiva,

sendo capaz de infectar células mitóticas e pós-mitóticas e, portanto, são considerados um bom veículo para a entrega de genes terapêuticos. É considerado um vírus não patogênico, o que reforça a sua adequação como vetor em terapia gênica. Os vetores adeno-associados recombinantes foram construídos substituindo os genes *Rep* e *Cap* pela cassete de expressão dos transgenes (**Figura 3.6**) [45], [88], [89].

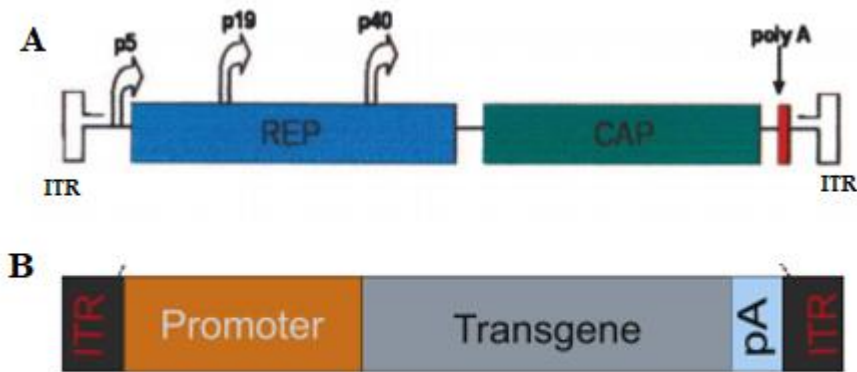


Figura 3.6- Representação esquemática do genoma do wild-type do AAV2 (A) Genes Rep e Cap, com os respectivos promotores (p) para as proteínas transcritas e os componentes de um vetor rAAV (B) no qual os genes Rep e Cap foram substituídos pelo transgene, mantendo o promotor + polyA + ITR (sequências cis necessárias para replicação e empacotamento no capsídeo. Adaptado de S. Daya and K. I. Berns, “Gene therapy using adeno-associated virus vectors,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, no. 4. American Society for Microbiology Journals, pp. 583–593, 01-Oct-2008, doi: 10.1128/CMR.00008-08 © C. A. Maguire and D. P. Corey, “Viral vectors for gene delivery to the inner ear,” *Hearing Research*. Elsevier B.V., p. 107927, 23-Feb-2020, doi: 10.1016/j.heares.2020.107927.

Um serotipo é definido como um vírus recém isolado, que não reage de maneira eficiente com soros específicos neutralizantes para os outros serótipos caracterizados. Cada serotipo de AAV interage com diferentes recetores nas células alvo sendo que esta variedade de serotipos permite que se possa selecionar qual o mais adequado a ser utilizado em terapia gênica. O serotipo AAV2 foi um dos primeiros a ser identificados e sequenciado, utilizando-se, na maior parte dos rAAV, as repetições terminais invertidas (*ITRs*, do inglês *inverse terminal repeat*) deste serotipo para o desenho de vetores. No entanto, a eficácia dos rAAV é em grande parte determinada pela interação entre o capsídeo e os recetores de superfície da célula alvo [88], [90], [91].

Os vetores adenoassociados podem ser utilizados para diversas aplicações. Veja-se, por exemplo, uma deficiência na proteína tirosina-cinase *MER* (*MERTK*, do inglês *tyrosine-protein kinase MER*) causa uma profunda degeneração da retina. Num estudo, foram usados vetores com base em AAV para transferir o gene *MERTK* correto no

epitélio pigmentado da retina de ratos, o que conduziu a uma melhoria transitória da visão durante 9 semanas. Outro estudo bem sucedido em terapia génica ocular, englobou a entrega do gene *RPE65*. Num modelo de canino Briard com amaurose congénita de Leber do tipo 2, com uma mutação homozigótica do *RPE65* demonstrou que a injeção subretiniana de um vector AAV2 com o gene canino *RPE65* normal, sob o controlo do promotor CBA, foi suficiente para restaurar a função visual dos cães afetados, permitindo abrir portas para ensaios clínicos posteriores nesta área que demonstraram, por sua vez, a segurança da administração na retina de vectores AAV. Mas os vectores AAV foram também utilizados noutras aplicações não oculares. O carcinoma hepatocelular (HCC, do inglês *hepatocellular carcinoma*) é um tumor agressivo, responsável por cerca de 85-90% dos cancros de fígado e com mau prognóstico. Sabe-se que, microRNA26 e microRNA122 estão frequentemente desregulados em tecidos com HCC, sendo normalmente responsáveis por regular a apoptose e suprimir metástases. A entrega deste miRNA, com recurso a rAAV3, para suprimir o crescimento do tumor em células de HCC humanas, demonstrou que a inibição do crescimento é dependente da dose, em modelos *in vitro*, no entanto, esta inibição é transitória, devido à rápida proliferação das células e consequente diminuição da concentração do vector [48], [92]–[94].

Os estudos pré-clínicos e clínicos utilizando vectores AAV, permitiram demonstrar que estes possuem um alto nível de tropismo, que a expressão do transgene é de longa duração (superior a um ano) em vários tecidos e apresentam um bom perfil de segurança e baixa imunogenicidade, particularmente *in vivo*, devido à remoção completa das sequências de codificação virais e ao facto de não transduzirem eficientemente células apresentadoras de antígenos [91], [95].

No entanto, a sua capacidade de clonagem é muito limitada, como não se integra no genoma do hospedeiro, à medida que as células sofrem replicação, a duração e concentração da expressão do transgene é diminuída e apenas comporta cassetes (promotor + gene + sinal de poliadenilação) terapêuticas com tamanho inferior a 5 kbp. Para além disto, a conversão da cadeia simples numa cadeia dupla, pode ser considerada um passo limitante [88][91].

3.2.3. Vectores Retrovirais

Estes vectores foram desenvolvidos com base em retrovírus. São vírus com cerca de 80-120 nm de diâmetro, com envelope, genoma de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*), de cadeia simples (duas cópias), que é transcrito para um DNA intermediário após infecção e que se integra no genoma do hospedeiro. Na forma mais simples, o genoma dos retrovírus (**Figura 3.7**) é formado por três genes, *gag*, *pol* e *env*, ladeado pelas longas sequências repetitivas (LTR, do inglês *long terminal repeat*), responsáveis pela expressão do genoma viral. Os vectores virais baseados em retrovírus possuem uma especificidade elevada para células CD34+, integração estável no genoma do hospedeiro, capacidade de transportar genes de tamanho inferior a 8 kbp (aproximadamente) e são construídos através da substituição do genoma viral pela cassete de expressão do transgene, mantendo as LTR e o sinal de empacotamento [45][96].

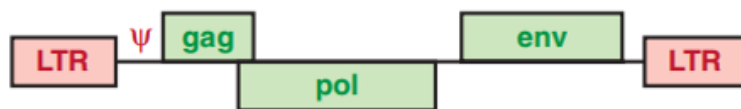
Uma vantagem na utilização destes vírus como vectores de entrega em terapia génica é que, a entrada celular, a transcrição reversa do genoma de RNA e a integração do DNA proviral no cromossoma do hospedeiro são mediados por proteínas transportadas na partícula do vírus, o que aumenta a sua eficácia. Outra vantagem associada é, permitir uma expressão do transgene a longo prazo [97].

No entanto, esta última vantagem pode também constituir uma desvantagem, uma vez que, a integração pode conduzir a uma mutagénese por inserção aleatória no DNA do hospedeiro (podendo, por exemplo, ativar um oncogene). Outras desvantagens incluem uma baixa eficiência *in vivo*, problema imunogénicos e o facto de alguns retrovírus serem incapazes de traduzir células que não se encontrem em divisão [45], [49].

Esta classe de vírus engloba os gamma-retrovírus e os lentivírus, os quais também são utilizados para o desenvolvimento de vectores de terapia génica. A maior parte dos vectores gammaretrovirais foram desenvolvidos com base no MVL, tendo uma grande desvantagem: só conseguem infetar células em proliferação, sendo por isso, atualmente menos utilizado que os lentivírus, no entanto, os primeiros ensaios clínicos de sucesso em terapia génica para tratar doenças hereditárias monogénicas foram realizados com vectores gammaretrovirais. O vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*), por exemplo, é um lentivírus (**Figura 3.7**) com interesse como vector em terapia génica, devido à capacidade de infetar células que não se encontram em

divisão (células em G0 ou G1), com grande eficiência, ampliando a aplicabilidade do vírus e com melhor perfil de segurança relativamente à activação de protooncogenes (preferência por unidades transcricionais em vez de sequências reguladoras), comparativamente com os MVL, podendo ter interesse acrescido em células do tecido neuronal e células hematopoiéticas. Estes vectores preservam o gene *gag* de forma não funcional e substituem os genes virais pelos transgenes, ficando dependentes de um sistema auxiliar. São alterações que fazem com que a capacidade de transcrição viral seja perdida, minimizando o fenómeno de interferência com o promotor e o risco de ativar genes próximos de locais de integração genómica. Outras soluções para este problema envolvem, a adição de isoladores, sequências genómicas de DNA, capazes de impedir a interação entre o vector integrador e as sequências genómicas reguladoras [78], [97]–[99].

A - Retrovírus



B - Lentivírus

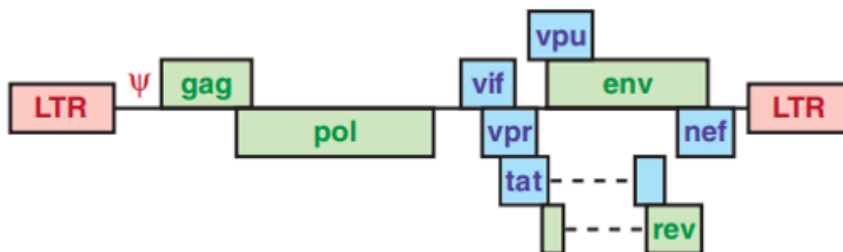


Figura 3.7 – Representação do genoma de um retrovírus (A) que codifica para os genes da proteína *gag*, *pol* e *env*, flanqueado por LTRs e de um lentivírus (B) que, inclui também os genes acessórios, normalmente deletados para o fabrico de um vector viral. Adaptado de I. M. Verma and M. D. Weitzman, “GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 711–738, Jun. 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637.

A primeira geração de vectores com base em lentivírus, tinha um plasmídeo de empacotamento que fornecia todos os genes virais codificantes, reguladores e acessórios (*tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *nef* e *vif*), mas após a identificação dos genes “descartáveis” para a transferência de carga genética, permitiu a construção da segunda geração de vectores, onde foram retirados os genes acessórios, sem afetar a eficiência de infeção. Na terceira

geração de vectores (**Figura 3.8**), o sistema de empacotamento do genoma é dividido no plasmídeo que expressa o envelope e o plasmídeo com os restantes genes codificantes e no vector plasmídeo com o transgene e as LTR, com um promotor independente de *tat* [96], [99].

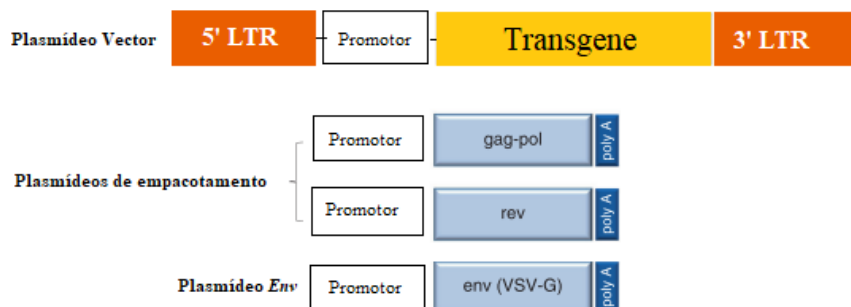


Figura 3.8 – Representação de um vector baseado em lentivírus de terceira geração. O transgene terapêutico é inserido entre as LTRs virais sendo que as sequências gag, pol, rev e env (codifica para o envelope viral) são fornecidas por plasmídeos separados para fabricar o vector. Adaptado de M. C. Milone and U. O’Doherty, “Clinical use of lentiviral vectors,” *Leukemia*, vol. 32, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 1529–1541, 01-Jul-2018, doi: 10.1038/s41375-018-0106-0.

O uso de retrovírus para o potencial tratamento de SCID e distúrbios hereditários monogénicos do sangue tem sido amplamente estudado. O ensaio clínico referido anteriormente da transferência do gene funcional *ADA* para jovens com ADA-SCID, foi realizado com gammaretrovírus. Neste ensaio clínico, as células T foram transduzidas e expandidas *in vitro*, re-transplantadas para as doentes, o que resultou num aumento das células T em circulação, num aumento da actividade de ADA e numa diminuição da resposta imune. No entanto, não se podem confirmar a eficácia desta terapia génica neste ensaio clínico dado que dez anos após a realização do mesmo, um dos doentes tinha ainda o gene *ADA* retroviral transduzido e expressava-o em 20% das suas células, enquanto que o outro apenas expressava menos de 0,1% de células transduzidas. No entanto, consegue demonstrar a segurança do uso de vectores retrovirais e a possibilidade de transferência a longo prazo, embora haja declínio de função [97].

No caso da SCID-X, que causa um bloqueio no desenvolvimento de células T, a primeira cura de uma doença por terapia génica envolveu a infeção *ex vivo* de células CD34+ pelo retrovírus MFG-y. O número de células T atingiu um valor normal 3 a 4 meses após o tratamento e a função imune foi restaurada quase na totalidade. Esta

expressão apenas ocorreu em células T e NK. Este estudo também serviu para detetar os efeitos negativos associados a terapia gênica, dado que, três crianças envolvidas em ensaios clínicos desenvolveram proliferação descontrolada de células T, devido a uma integração proviral próxima do promotor LMO2 (protooncogene) levando a expressão anormal e sobregulada da proteína LMO2 [97].

Vectores virais derivados dos spumavirus, capazes de infectar uma enorme variedade de células, incluindo células neuronais, têm sido muito estudados, pelo facto de conseguirem acomodar grandes cassetes de expressão (até cerca de 9.2 kbp), menor patogenicidade e genotoxicidade, mesmo quando inseridos próximo dos genes cromossómico do hospedeiro, dado que não são agentes patógenicos naturalmente encontrados em humanos [45][100].

3.2.4. Outros Vectores Retrovirais

O vírus do *Herpes Simplex* tem capacidade de infectar células do sistema nervoso central e periférico, ganhando especial atenção como vector de entrega nas doenças neuronais. O seu genoma é de DNA linear duplo, com aproximadamente 152 kbp, sendo grande parte do mesmo dispensável, permitindo então acomodar um transgene de elevado tamanho e com tropismo para células neuronais. Tem a capacidade de estabelecer um estado de latência, com posterior reativação e não se integra no genoma do hospedeiro, razão pela qual só se consegue obter uma expressão transiente, mas reduzindo o risco de mutagenese por inserção e, consegue infectar células em divisão e células que não se encontram em divisão. No entanto, a sua utilização *in vivo*, tem algumas desvantagens devido à presença de anticorpos contra o HSV-1 na maioria dos adultos [45][101].

Além disso, o facto de ser um agente patógeno natural em seres humanos, reforça a importância da inactivação viral, para impedir efeitos adversos. Vectores virais com base no HSV, nos quais todo o genoma viral é fornecido em plasmídeos de empacotamento, designados por amplicons, originam vectores sem replicação viral, amplamente utilizados em estudos pré-clínicos. O acidente vascular cerebral isquémico agudo tem como objetivo terapêutico principal, a reperfusão. Amplicons têm sido usados para fornecer vários genes terapêuticos, em modelos animais, como, por exemplo, a sobexpressão do transportador de glicose GLUT-1, que melhora a captação da glucose e reduz a perda neuronal. Apesar de se apresentarem resultados promissores, é necessário

transduzir um grande número de células, por uma via de administração aplicável em contexto clínico agudo, como a via intramuscular. Por outro lado, vectores competentes para a replicação, sendo esta seletiva, são amplamente estudados para o uso em tumores. A doença de Parkinson, cujas abordagens de terapia génica envolvem a suplementação da produção deficiente de dopamina, é uma das doenças que pode tirar vantagem do alto tropismo dos HSV. Amplicons utilizados para fornecer o gene da tirosina hidroxilase e a enzima responsável pela conversão da L-DOPA em DOPA, no estriado de modelos animais, resultou no aumento da produção de dopamina e recuperação comportamental prolongada, durante aproximadamente 4 meses [102], [103].

O vírus Epstein-Bar (EBV, do inglês *Epstein-Barr Virus*) pertence à família do herpesvírus e caracteriza-se por ter cadeia dupla de DNA, com capacidade para expressar grandes fragmentos de DNA. Além disso, estabelece-se no núcleo do hospedeiro em estado latente, sob a forma de plasmídeo circular extracromossómico e consegue alcançar níveis de expressão elevados. A capacidade de latência, está associada à origem de replicação viral latente, designada por oriP e ao antigénio nuclear EBV 1- EBNA, que atuam, replicando o genoma viral e retendo-o no núcleo. Vectores com base no EBV, contendo o gene que codifica para a alfa1- antitripisina, *in vitro*, demonstraram sofrer replicação extracromossómica eficiente, em células em divisão e mostram também capacidade de expressão a longo prazo [104][105].

Tabela II - Principais Características dos Sistemas de Entrega Virais

Vector Viral	Tamanho (aprox.) do transgene (kb)	Vantagens	Desvantagens
Vector Adenovíral	36 kb	<u>Elevada</u> eficiência transdução; Infeta células em divisão e não-divisão; Aplicação oncolítica	<u>Imunogenicidade</u> e baixa segurança <i>in vivo</i> ; Expressão transgene <u>transiente</u> ;
Vector Adeno-Associado	Até 5 kb	<u>Expressão longa</u> (> 1 ano); <u>Baixa</u> imunogenicidade e bom perfil	Não sofre integração no genoma hospedeiro; <u>Comporta transgenes de tamanho reduzido</u>

		segurança; <u>Elevada</u> eficiência transdução	
Vector Retroviral	8 kb	Integração estável; <u>Elevada eficácia de</u> <u>transdução</u> ; Baixa imunogenicidade; <u>Expressão a longo</u> <u>prazo</u> ;	Baixa eficiência in vivo; <u>Risco mutagénese por</u> <u>inserção aleatória</u>
Vector HSV	20 kb	Aporta transgene de tamanho elevado; Tropismo para células neuronais;	Expressão transiente

4. Estratégias Terapêuticas

É considerando as bases genéticas das patologias que se estabelecem a maior parte estratégias terapêuticas existentes, sendo os mecanismos propostos direcionados para que limitem ou alterem modificações indesejadas. Para doenças dominantes, uma única cópia defeituosa conduz ao fenótipo da doença. Portanto, nestas o objetivo principal da terapia génica será reduzir ou inibir completamente a expressão do gene mutado. Existem essencialmente dois tipos principais de terapia génica para esta estratégia, o silenciamento de genes, por norma, com métodos baseados em RNA, e a edição de genes, que tem como objetivo a correção dos genes e dos seus defeitos ao nível do DNA. Em patologias nas quais há perda de função de um gene, o tratamento ou prevenção, abrange a entrega de uma cópia do gene funcional ou a transferência de fatores terapêuticos em falta [106].

4.1. Transferência de Genes

A entrega terapêutica de genes envolve a introdução ou a substituição de material genético recombinante (**Figura 4.1**), de forma a alterar os níveis dos produtos do gene endogéno, que se encontra inativo ou em falta. Pode ocorrer diretamente *in vivo* ou ser administrado *ex vivo*. Um exemplo desta estratégia terapêutica, ocorre no caso da deficiência familiar da lipoproteína lipase (LPL), enzima responsável por decompor gorduras, cujos doentes sofrem pancreatites recorrentes. O *Glybera* aporta uma cópia do gene humano LPL, associada a um vector rAAV1. É administrada por uma série única de injeções intramusculares, resultando na produção e secreção da enzima por estes tecidos, auxiliando na degradação das gorduras armazenadas nas vesículas em circulação, minimizando a gravidade da doença. A transferência de fatores de coagulação, mais precisamente do factor de coagulação sanguínea IX, na Hemofília B, causada pela deficiência no gene que o codifica, para o fígado ou músculo tem mostrado eficácia clínica, com produção dependente da dose. Apesar de estar associada a uma resposta imune de células T citotóxicas, devido ao vector de entrega, AAV, estes desenvolvimentos suportam a transferência de genes com o objetivo de produzir proteínas terapêuticas. A adição de genes, está associada a doenças nas quais o efeito das mesmas pode ser minimizado, não pela correção de algum defeito num gene existente, mas pela adição de um gene terapêutico que possa melhorar alguma via específica. Por exemplo, na insuficiência cardíaca, há alteração no transporte de cálcio nas células musculares,

associado a uma diminuição da atividade da bomba ATPaseCa²⁺ do retículo sarcoplasmático (SARCA2a). A sobreexpressão de SARCA2a nas células musculares cardíacas melhora a função cardíaca em diversos modelos animais, até 12 meses após o tratamento [24], [107]–[109].

A) Transferência de Genes por Substituição ou Adição

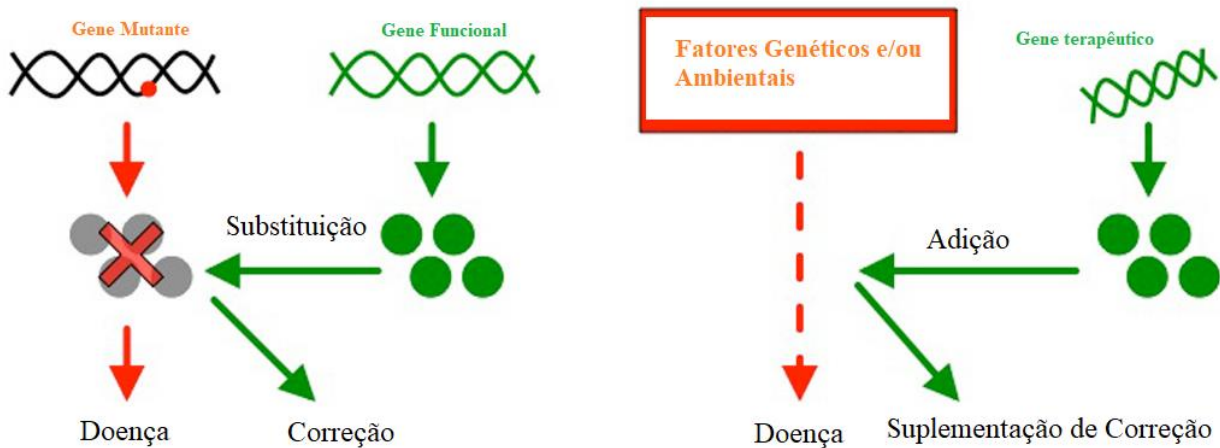


Figura 4.1- Representação esquemática da transferência de genes por substituição (parte esquerda) ou por adição (parte direita). Uma mutação num gene, anula a síntese de proteínas, dando origem à doença. A substituição deste gene mutado, por uma cópia funcional do gene vai originar a produção das proteínas “normais”. Factores genéticos ou ambientais podem também resultar em doença. A adição de genes pode minimizar os efeitos adversos da doença, suplementando genes que visam um aspeto específico da mesma. Adaptado de D. Wang and G. Gao, “State-of-the-art human gene therapy: Part II. gene therapy strategies and clinical applications,” *Discov. Med.*, vol. 18, no. 98, pp. 151–161, 2014.

4.2. Silenciamento de Genes

O silenciamento de genes mutados constitui uma das estratégias terapêuticas utilizadas em terapia génica e recorre a métodos que usam RNA de interferência (iRNA, do inglês, *interference RNA*), oligonucleotídeos *antisense* (ASOs, do inglês *Antisense Oligonucleotides*), ribozimas, DNazimas ou aptâmeros. Embora cada uma destas metodologias atue através de mecanismos diferentes, baseiam-se todos no princípio que, a administração ou expressão dirigida de moléculas de DNA ou RNA exógeno, pode regular o tipo e a extensão da expressão génica dos alvos moleculares. Esta abordagem consiste em impedir que o gene mutado responsável por determinada patologia produza a proteína por ele codificada prevenindo, desta forma, o fenótipo resultante [110].

As estratégias mais utilizadas são mediadas por iRNA e ASOs, tendo apresentado elevada especificidade e toxicidade reduzida. Podem também ser divididas entre silenciamento de genes pós-transcrição (PTGS, do inglês *post-transcriptional gene silencing*) ou silenciamento de genes transcricional (TGS, do inglês *transcriptional gene silencing*) [110].

4.2.1. RNA de Interferência

A descoberta de uma tecnologia de silenciamento de genes, por Fire e Mello, desencadeada por RNA de cadeia dupla, através do estudo no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, em 1998, a qual foi denominada de iRNA, concedeu-lhes o Prémio Nobel da Medicina em 2006 e conduziu à tentativa de a aplicar em células humanas. Esta abordagem depende da homologia entre as moléculas do iRNA e o RNA mensageiro (mRNA, do inglês *Messenger RNA*) alvo, de forma a reprimir a expressão génica, desencadeando a degradação do mRNA e/ou inibindo a síntese de proteínas. Estas moléculas inibitórias incluem shRNA (do inglês *short hairpin RNA*), siRNA, ou microRNA (miRNA, do inglês *microRNA*) [106], [111]–[114].

O processo pelo qual o silenciamento de genes ocorre, inicia-se pela transferência das moléculas de iRNA, no citoplasma das células, para o complexo endógeno de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA induced silencing complex*) que reconhece as moléculas de RNA de cadeia dupla. As cadeias de RNA são separadas por uma enzima helicase, na qual a cadeia-mãe, guia o complexo para a região complementar do mRNA alvo, de forma a degradá-lo ou bloquear a sua tradução. O complexo RISC é constituído por proteínas da família Argonaute (AGO), sendo que apenas a AGO2 possui a capacidade de clivagem responsável pelo silenciamento induzido pelo iRNA (o domínio desta proteína responsável pela clivagem é denominado de PIWI). Após a clivagem de uma molécula de mRNA, o complexo liga-se à cadeia de mRNA seguinte. Os genes resultantes deste processo são transcritos, mas não conseguem ser traduzidos [106], [110], [114]–[116].

Por sua vez, o miRNA, uma classe de RNA endógeno não codificante, é transcrito no núcleo, e sofre um processo semelhante ao shRNA (abaixo referido), de forma a ser

incorporado no RISC (**Figura 4.2**). No entanto, estas moléculas de RNA apenas são parcialmente complementares aos seus mRNAs-alvo na região 3' não traduzida [114].

Dependendo do iRNA ao qual se recorre, o processo de silenciamento de genes e a eficiência do mesmo são distintos. Por exemplo, o siRNA, de cadeia dupla com aproximadamente 21 nucleótidos, incorpora-se diretamente no RISC, sofrendo apenas processamento anterior pela Dicer (**Figura 4.2**). Por outro lado, o shRNA é transcrito no núcleo, processado pela Drosha, uma enzima da ribonuclease III, transportado para o citoplasma onde irá sofrer a ação da nuclease Dicer e só depois incorporado no RISC (**Figura 4.2**). Em termos de comparação, o shRNA é sintetizado no núcleo nas células hospedeiras, levando a um silenciamento genético de maior duração e com preço de produção mais acessível que o siRNA. A facilidade com que o shRNA consegue ser incorporado num vector viral é uma das vantagens mais identificadas neste método, embora a expressão em excesso deste possa ter alguma toxicidade [114], [117].

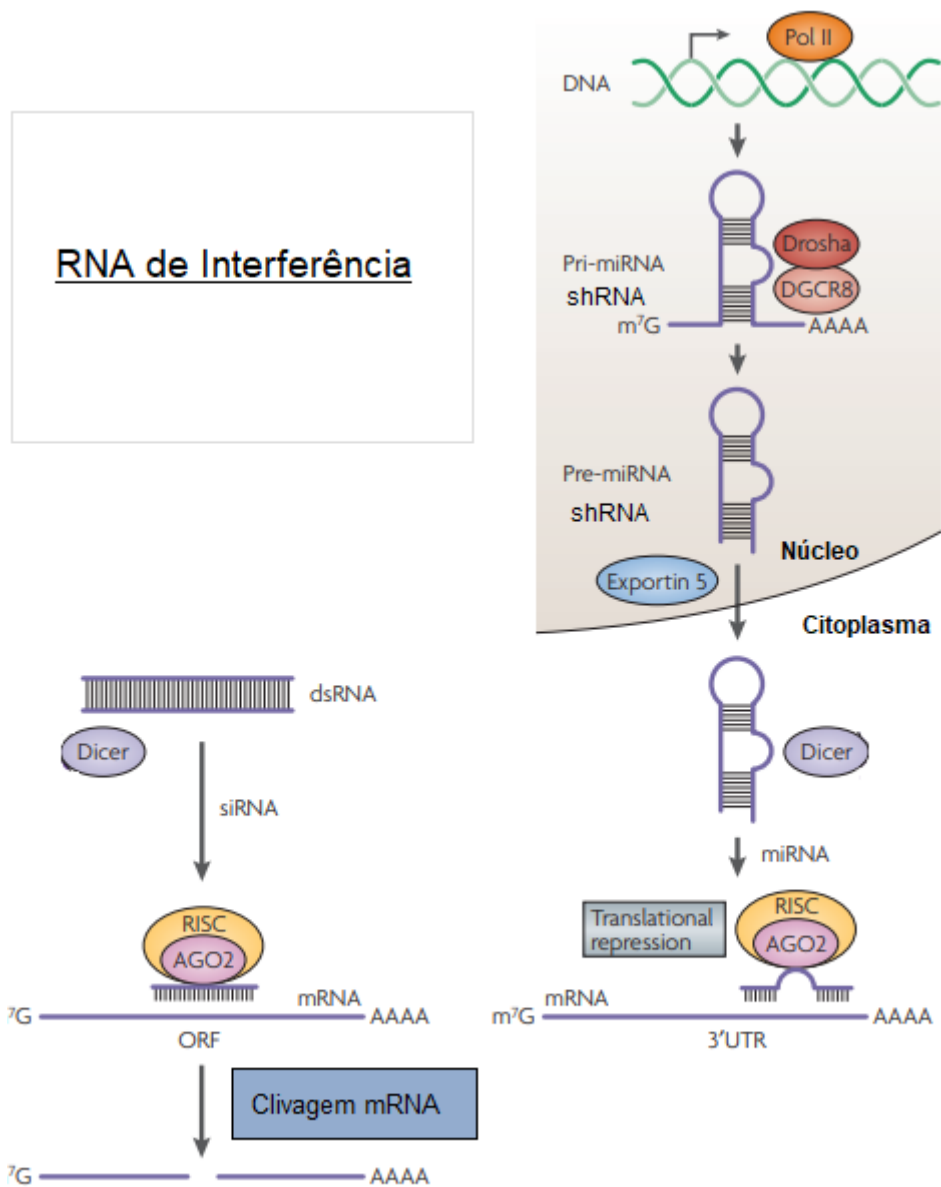


Figura 4.2- Mecanismo de silenciamento de genes baseado em RNA de Interferência. RNAs citoplasmáticos de cadeia dupla (dsRNA) são processados por Dicer em RNA de interferência, como o siRNA, que é introduzido directamente no complexo RISC. A cadeia líder de siRNA reconhece os locais de clivagem, realizada por AGO2. Por outro lado, transcritos primário de miRNA ou de shRNA são processados no núcleo, por Drosha, transportados para o citoplasma, processados por Dicer e introduzidos no complexo silenciamento. Adaptado de D. H. Kim and J. J. Rossi, “Strategies for silencing human disease using RNA interference,” Nature Reviews Genetics, vol. 8, no. 3. pp. 173–184, Mar-2007, doi: 10.1038/nrg2006.

É de realçar que, a escolha da região do mRNA a ser clivada deve ser específica, dado que, o siRNA pode reduzir tanto a expressão da proteína mutante tóxica e da proteína não mutante, expressa a partir da segunda cópia do gene em um genoma diplóide, o que pode prejudicar a função normal do gene. Uma solução possível, seria um iRNA

específico do alelo que visa apenas a cópia do gene mutante, de forma a diminuir o efeito tóxico da proteína do gene, como por exemplo, na proteína huntingtina mutante, na doença de Huntington (HD, do inglês *Huntington Disease*), preservando a cópia normal do gene. O silenciamento específico de alelos, na Doença de Machado-Joseph, causada pela repetição excessiva de um codão CAG no gene *MJD1*, que confere um ganho de toxicidade à proteína mutante ataxina 3, demonstrou uma melhoria no fenótipo comportamental e neuropatológico da doença, em modelos animais. Com recurso a shRNA específico de alelos, foi possível reduzir as níveis da proteína mutante e mostrar que esta estratégia é altamente eficaz, mesmo em estádios mais avançados da doença [106], [110], [118], [119].

4.2.2 – Oligonucleótidos Antisense

Os oligonucleótidos *antisense* são uma das estratégias terapêuticas usadas na terapia génica. Caraterizados por serem cadeias curtas (entre 15-20 nucleótidos) análogas de um desoxorribunocléotido, que se liga ao mRNA complementar formando uma ligação RNA-DNA, e cuja atividade pode ser dependente da ribonuclease H (RNase H) ou independente da mesma. O seu uso, tal como a estratégia anterior, tem como objetivo, bloquear seletivamente a expressão do gene alvo, inibindo a tradução. A eficiência desta estratégia está em grande parte relacionada a identificação de locais alvos acessíveis [120], [121].

Esta estratégia de silenciamento de genes, atua através de dois mecanismos: o que envolve a ativação da enzima RNase H e o que impede a atividade dos ribossomas, interferindo também na maturação do próprio mRNA por inibição ou destabilização do mesmo no núcleo (**Figura 4.3**). A ligação entre os oligonucleótidos antisense e o mRNA, mediada pela enzima RNase, ativa a degradação do mRNA alvo. O segundo mecanismo, envolve a ligação específica dos ASOs ao mRNA alvo, impedindo a translocação e leitura da informação contida no mesmo pelos ribossomas, devido ao efeito estérico direto. Ambos os mecanismos resultam numa regulação negativa da proteína expressada [120], [122].

O mecanismo selecionado depende da composição química do ASO utilizado, bem como do local onde a hibridização é realizada. Uma vez que os ASOs são facilmente degradados pelas nucleases, por tal, de forma a serem usados como terapêutica, devem

ser modificados. Além disso, a sua modificação permite melhorar o transporte intracelular. As modificações mais usuais estão associadas a análogos com bases não naturais, açúcares modificados (na posição 2' da ribose, particularmente) ou grupos fosfatos alterados. A primeira geração de ASOs modificados- oligonucleótidos fosforotioato (PS, do inglês *phosphorothioate oligonucleotides*) – caracteriza-se pela substituição de um dos átomos de oxigênio na ligação fosfodiéster, por um átomo de enxofre, aumentando, desta forma, a resistência às nucleases. No entanto, esta modificação está associada a alguma toxicidade transiente e dependente da dose. Estes ASOs possuem a capacidade de se ligarem inespecificamente a proteínas plasmáticas, sendo passíveis de, nesta forma ativar a cascata do complemento, através da ativação do fator H, fator regulador, resultando no aumento da divisão de produtos como C3a e C5a. Outra desvantagem associada está relacionada com a ativação da cascata de coagulação, pela ligação com os factores VIIa, IXa, X e II, resultando num aumento do tempo de trobolplastina parcial activada. A segunda geração de oligonucleótidos antisense está associada à modificação dos açúcares da posição 2' da ribose. No entanto, alguns destes ASOs, como o 2'-O-alkyl RNA, por exemplo, não conseguem induzir a RNase H, atuando apenas pelo mecanismo que impede a ligação dos ribossomas. Mais recentemente, oligonucleótidos onde o grupo fosfato é substituído por ligações de poliamida têm obtido resultados mais favoráveis que os restantes [120]–[122].

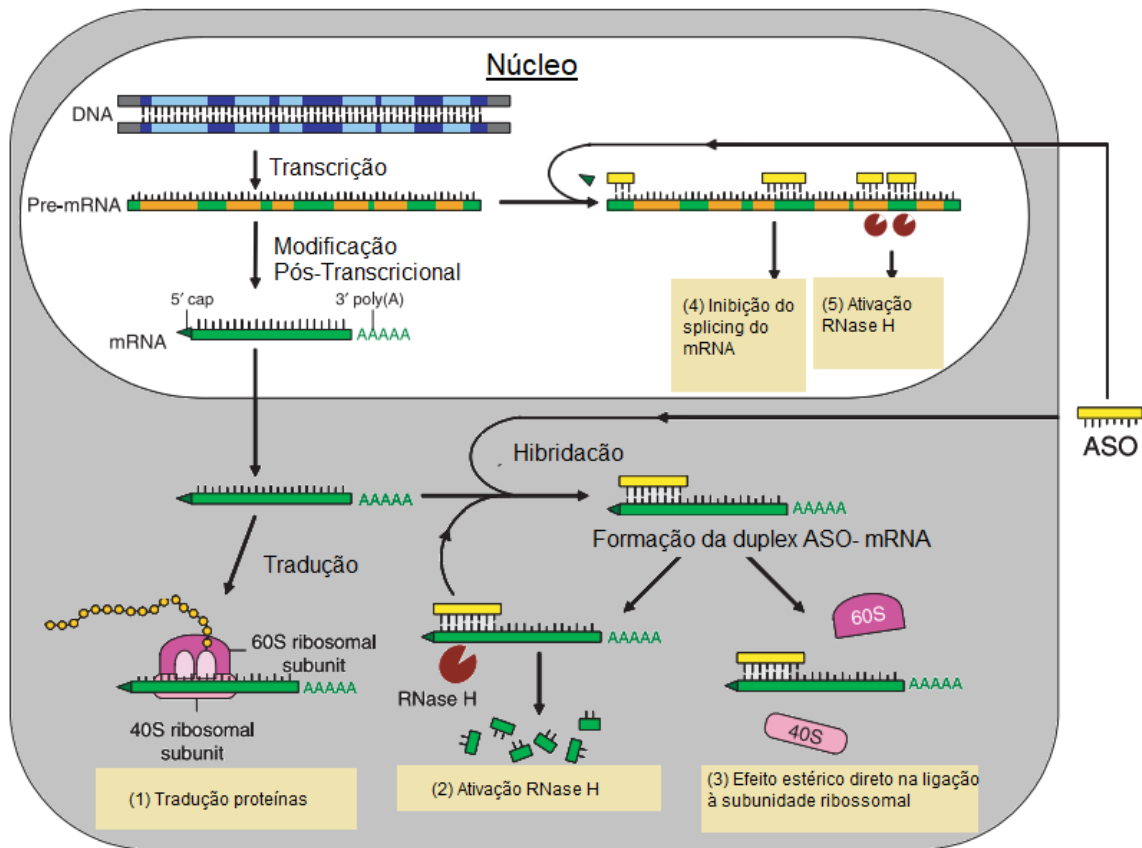


Figura 4.3- Silenciamento de genes baseado em oligonucleotídeos antisense (ASOs). A expressão e tradução de proteínas (1) pode ser alterada recorrendo a ASOs, que pode atuar por dois mecanismos. O ASO é captado por endocitose e sofre hibridização com o mRNA no citoplasma nas células. O complexo formado induz a ativação da RNase H (2) levando à degradação seletiva do mRNA ou por interferência estérica na ligação ao ribossoma (3). Outra alternativa é a entrada direta de ASO no núcleo das células e consequente inibição do splicing do RNA (4) ou ativação da RNase H. Adaptado de J. H. P. Chan, S. Lim, and W. S. F. Wong, “Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application,” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 33, no. 5–6. Blackwell Publishing, pp. 533–540, May-2006, doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x.

No caso da atrofia muscular espinhal, causada por mutações na sobrevivência do gene do neurónio motor 1 e perda da proteína SMN, um gene semelhante -*SMN2*, apenas difere do *SMN1* devido a uma alteração nucléotídica que interrompe um sinal de aprimoramento de *splicing* e exclui o exão 7 na maioria das células maduras de mRNA de *SMN2*, resultando em nenhuma produção funcional da proteína SMN. Como forma de resolver este problema, criou-se um determinado ASOs que é projetado de forma a forçar a inclusão do exão 7 no mRNA de *SMN2*- Spinraza, que permite a produção da proteína em falta pelo gene *SMN2*, aliviando os sintomas da doença (Ver **Capítulo 5**) [123].

Uma terapêutica aprovada pela FDA (1998) e pela EMA (1999) tem como base ASOs - fomivirsén, também designada por Vitravene. Consiste numa solução para

injeção intravítrea, com indicação para o tratamento local da retinite por citomegalovírus em doentes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Estruturalmente, caracteriza-se por ser um oligonucléotido PS, desenvolvido para ser complementar ao mRNA que codifica a maior parte da região IE2 do CMV. Estudos *in vitro* demonstraram que, através de um mecanismo dependente da ativação da RNase H, tem a capacidade de reduzir significativamente o mRNA alvo e conseqüentemente diminuir a progressão da doença [124]–[127].

4.4.3. Ribozimas e Aptâmeros

As ribozimas são moléculas baseadas em RNA catalítico, originalmente encontradas no protozoário *Tetrahymena*, que são modificadas, originando oligonucléotidos constituídos por dois domínios, um de ligação por complementaridade de bases e outro de clivagem. Após a clivagem, os produtos resultantes dissociam-se da ribozima, deixando-a disponível para outra hibridização. A sua ação catalítica é dependente da sua estrutura, tornando difícil a sua manipulação de forma a melhorar a sua eficiência ou toxicidade. Algumas vantagens associadas a esta estratégia terapêutica envolvem o facto de serem facilmente integradas num vector viral, devido ao seu tamanho. A sua aplicação tem sido estudada em doentes infetados com HIV, através da clivagem do mRNA que codifica para a proteína gag na sequência 5' da LTR [128]–[130].

Aptâmeros são pequenas moléculas de RNA ou ssDNA (12 a 30 nucleótidos) cuja atividade depende da sua estrutura terciária e quaternária. A conformação tridimensional específica, semelhante a anticorpos, pode formar complexos de alta afinidade com proteínas alvo e inibir a sua atividade, podendo sofrer alterações na sua estrutura interna, para melhorar o seu perfil farmacocinético. Vantagens associadas a este método incluem o facto de serem altamente estáveis mesmo a altas temperaturas, retomando facilmente a sua configuração original, não demonstrarem imunogenicidade mesmo quando em doses muito elevadas e devido ao seu pequeno tamanho a sua penetração intracelular é facilitada. Podem ter como alvo, proteínas extracelulares e intracelulares, ao contrário, por exemplo, dos ASOs [128], [131], [132].

Chegou a ser aprovado pela EMA um medicamento com base em aptâmeros-Macugen. Indicado para o tratamento da degenerescência macular neovascular, relacionada com a idade, o pegaptinib tem a capacidade de se ligar com elevada

especificidade ao VEGF165 – responsável pela angiogênese, tornando os vasos sanguíneos mais permeáveis- inibindo a sua atividade. A AIM deste medicamento foi revogada, no entanto, não devido a efeitos secundários associados [133].

4.3. Edição de Genes

A edição de genes é uma estratégia terapêutica que permite editar o genoma, ao nível do DNA, corrigindo mutações responsáveis por doenças genéticas, através da substituição do gene mutado ou adição de um gene em falta, restituindo a função em falta. As diferentes estratégias de edição recorrem, por norma, a nucleases, com capacidade para clivar sequências específicas do genoma e englobam meganucleases, as nucleases dedos de zinco (ZFN, do inglês *zinc finger nucleases*), as nucleases efetoras semelhantes a ativadores da transcrição – TALEN-, e o sistema de repetições palindrômicas agrupadas e regularmente interespeçadas -CRISPR/Cas 9.

De uma forma geral, as moléculas às quais se recorrem neste método, são constituídas por um domínio, que é proteico no caso das nucleases dedos de zinco e das TALEN ou de RNA nas CRISPR/Cas9, que se liga especificamente a uma sequência alvo do DNA, numa zona vizinha ao gene que se pretende editar. São também constituídas por um domínio catalítico que promove a quebra da cadeia de DNA, ou seja, são desenhadas para reconhecer especificamente uma sequência de DNA, promovendo a quebra da dupla hélice.

O desenvolvimento destas estratégias assenta na capacidade dos mecanismos de reparação celular do DNA. Dado que a quebra da dupla cadeia de DNA é um dano celular que pode conduzir a morte celular e a alterações graves no genoma, as células eucarióticas possuem mecanismos de reparação do DNA que são ativados após o processo de clivagem da mesma. Um destes mecanismos é a reparação homóloga, na qual a correção de DNA é feita por recombinação com a sequência. A recombinação não homóloga cria inserções ou deleções de nucleótidos, na ausência de um modelo homólogo para fazer a recombinação, mas raramente é usada como preferência dado a incontabilidade de possíveis mutações associadas[134]–[136].

4.2.1. Meganucleases

As meganucleases (MN) são endonucleases altamente específicas, cujo potencial terapêutico foi descrito pela primeira vez em 1980, que reconhecem e clivam longas sequências de DNA (aproximadamente entre 12-45 pares de bases), induzindo subsequentemente a reparação do DNA através de recombinação homóloga. Estas endonucleases podem ser divididas em cinco famílias, de acordo com a sua sequência e estrutura. Uma das famílias mais estudada, a LAGLIDADG, cuja estrutura forma um domínio de ligação ao DNA em forma de sela, catalisa a transferência lateral dos seus intrões, clivando alelos homólogos aos quais lhes falta um intrão, de forma a iniciar um processo de reparação por recombinação que usa o alelo do seu intrão como modelo de reparação. Ou seja, conseguindo duplicar o intrão no local alvo [137]–[140].

Um dos exemplos desta abordagem pode ser verificado na distrofia muscular de Duchenne, uma doença hereditária grave, que causa uma perda de massa muscular agravada, devido a mutações no gene *DMD*. Foi demonstrado que, a reparação da deleção de genes *DMD* humanos, no cromossoma X, pode ser conseguido através da clivagem do genoma num local específico induzida por MN e consequente recombinação homóloga dos exões em falta [141].

Uma das maiores limitações desta abordagem consiste na necessidade da sequência de DNA a clivar conter um local de clivagem das meganucleases e para tal, é necessário recorrer muitas vezes a meganucleases artificiais, que são desenhadas de acordo com a sequência do DNA alvo e cuja produção não apresenta o retorno previsto [142][143].

4.2.2. Nucleases Dedos de Zinco

As nucleases dedos de zinco são heterodímeros com um domínio de ligação ao DNA e um domínio da nuclease da enzima de restrição FokI, que promove a quebra da dupla cadeia do DNA (**Figura 4.4**). O domínio de ligação das ZFN contém uma matriz *tandem* de dedos Cys2-His2, cada uma com capacidade de reconhecer cerca de 3 pares de bases de DNA, ou seja, pode reconhecer aproximadamente entre 9-12 nucleótidos. O domínio de clivagem não possui afinidade específica para uma sequência, podendo ser alterado e redirecionado para domínios com reconhecimento específico, para além de que,

o domínio de ligação também pode ser otimizado. As modificações que recorrem a ZFN podem ser realizadas tanto por recombinação homóloga como por recombinação não homóloga [134], [143]–[147].

Estas moléculas possuem limitações importantes para a sua utilização generalizada, nomeadamente a necessidade de recorrer a estratégias complexas para a produção de nucleases dedos de zinco com suficiente afinidade e especificidade para o alvo que, comparativamente a TALENs ou CRISPR/C9as, apresenta-se mais demorada. Para além disso, também possuem efeitos adversos, como promoverem a quebra da dupla cadeia de DNA noutros locais do genoma que possuam um certo grau de homologia com o alvo molecular, podendo levar a mutações indesejadas [143], [147].

As ZFN foram usadas pela primeira vez num ensaio clínico em 2014, de forma a inativar o gene *CCR5* nas células CD4+ T de doentes infetados com HIV, originando células resistentes à infeção, no entanto, apesar de se mostrar seguro, a eficiência era baixa, não sendo conseguido controlar a carga viral após a interrupção do tratamento. Outro ensaio *in vivo*, recorrendo a modelos de murganhos com hemofilia B49 e com base na restauração da atividade do factor IX teve resultados promissores. Com recurso às ZFN, demonstrou-se que até 7% dos alelos mutados do fator referido podem ser corrigidos, resultando numa melhoria na formação de coágulos. O facto de a correção genética se ter apresentado segura e eficaz *in vivo*, torna as ZFN uma estratégia viável para o tratamento de doenças genéticas [135], [144], [148].

4.2.3. TALEN

As nucleases efectoras semelhantes a ativadores transcricionais (TALEN) ocorrem em bactérias patogénicas das plantas *Xanthomonas* e possuem um domínio de ligação ao DNA juntamente com um domínio nucleasa da enzima de restrição FokI, tal como as ZNF (**Figura 4.4**). Apresentam um domínio N-terminal de translocação, um domínio de repetição central TALEN que medeia a ligação ao DNA, constituído por cerca de 34 cópias de nucleótidos, sendo que cada um reconhece uma base no alvo de DNA formando ao redor da hélice de DNA uma configuração que determina a especificidade da ligação e, uma região C terminal que possui um sinal de localização nuclear e um domínio de activação da transcrição, e o domínio de clivagem, anteriormente referido [143], [149], [150].

O uso de TALEN para a redução do alelo mutante da proteína huntingtina, na HD, devido à expansão da CAG levou à alteração dos TALEN para ter como alvo uma sequência específica de DNA no alelo mutante e, após o estudo em questão, foi notado uma redução de cerca de 68% dos alelos mutados, 24 horas após o ensaio. No entanto, estes resultados não têm significado clínico relativamente à alteração do curso da doença, dado que a percentagem de alelos não mutantes a serem alterados para se obterem resultados significativos é desconhecida [151].

Esta tecnologia é muito promissora principalmente no que diz respeito à especificidade, potência da eficácia e sem apresentar toxicidade considerável. No entanto, a entrega torna-se mais difícil que as restantes nucleases apresentadas devido ao seu tamanho e às sequências repetidas [151], [152].

4.2.4. CRISPR/Cas9

A tecnologia de repetições palindrômicas intercaladas curtas regularmente agrupadas (CRISPR) foi descoberta, por fazer parte do sistema imunológico adaptativo das bactérias. Nesta abordagem, a correção do genoma é mediada por endonucleases guiadas por RNA. Deste modo, nas células em que se pretende efetuar a correção genómica é necessário introduzir e/ou expressar dois componentes, uma nuclease mediada por RNA, como a Cas9 (codificada pelo locus genómico CRISPR) e um “RNA-guia”, sendo este último constituído por dois blocos: o CRISPR RNA e o trans-ativador CRISPR RNA (tracrRNA). A porção CRISPR RNA (crRNA) tem uma sequência de 20 nucleótidos na região terminal 5' e estabelece o local de corte, que é específico do gene a corrigir, enquanto o tracrRNA é constante. A estrutura deste complexo crRNA e tracrRNA, atrai a Cas9 para o complexo de clivagem, permitindo direcionar a atividade da mesma para qualquer sequência de DNA, desde que haja uma sequência PAM no DNA complementar, específica de Cas9 consoante a origem da espécie da mesma. Desta forma, é possível quebrar a dupla cadeia do DNA, posteriormente a serem reparadas por recombinação homóloga ou não homóloga. A Cas9 mais usada é derivada do *Streptococcus pyogenes* (SpCAS9). Comparativamente a outras estratégias, não envolve a produção de alvos específicos, sendo apenas necessário ajustar o RNA de guia único (sgRNA), de forma a torná-lo específico [136], [143], [152], [153].

Apesar de ter demonstrado uma eficácia superior às outras endonucleases utilizadas, fatores como a seleção do local alvo, a clivagem não programada, a atividade das Cas9 e o método de entrega, influenciam bastante esta abordagem. A presença de uma sequência PAM também é necessária, de forma a concluir a ligação ao DNA complementar. Uma das soluções principais para evitar os efeitos indesejados da clivagem por CRISPR/Cas9 aborda uma seleção rigorosa do sgRNA utilizado e não existir nenhuma sequência PAM fora do local alvo [136], [152], [153].

Alguns estudos sobre a abordagem CRISPR/Cas9 e o HIV-1 sugerem a eficácia deste método, através da supressão da expressão de genes do HIV-1 em algumas linhagens celular, tendo como alvo o gene *CCR5* (recorrendo a uma metodologia *ex vivo* em células T e células CD34+ do doente), resultando na inibição da transcrição e replicação do pró-vírus. Na Doença de Huntington, o uso desta tecnologia para a inativar o alelo mutante *HTT*, em modelos animais, resultou na redução da expressão do alelo em questão. O uso da tecnologia CRISPR/Cas9 foi alargada a embriões humanos, por uma equipa de investigadores liderada por He Jiankui, que num projeto que juntava fertilização *in vitro* e edição genómica, no gene *CCR5*, numa tentativa de conferir resistência ao HIV. Os primeiros bebés geneticamente modificados nasceram em Outubro de 2018, aparentemente saudáveis. O genoma dos bebés em questão, no entanto, apresentava ainda mutações no gene *CCR5*, ou seja, estando ainda passíveis de ser infetados. Alguns dados reportam, alterações a nível do cérebro, possivelmente devido à ligação entre o gene *CCR5* e o aumento da memória em modelos animais. Este caso originou controvérsia ética e legal, sendo as ações do investigador fortemente criticadas pela comunidade científica [154]–[158].

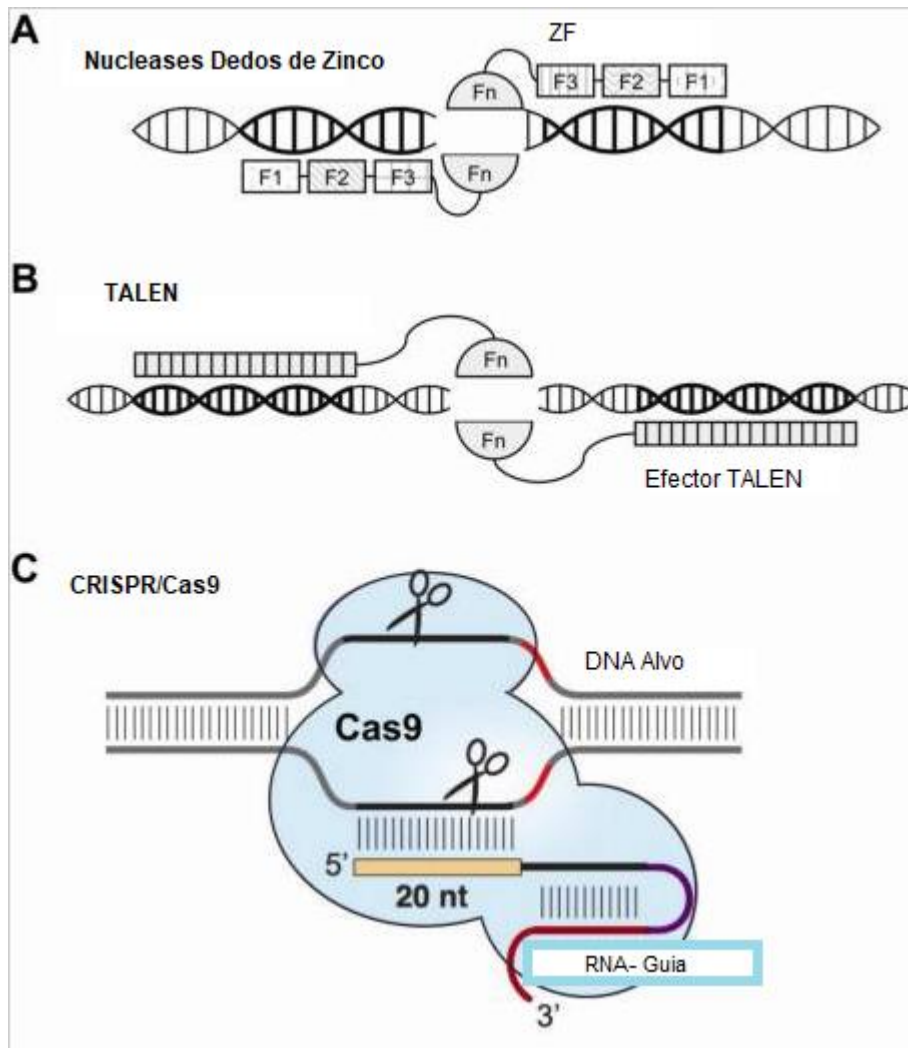


Figura 4.4- Imagem esquemática de estratégias usadas na edição de genes. As nucleases dedos de zinco (A) são formadas pelo acoplamento de dedos de zinco a domínios da nuclease FokI, que se ligam e clivam determinada sequência de DNA. As nucleases efectoras semelhantes a ativadores transcricionais (B) são formadas por um domínio da nuclease FokI e por um efector TALEN, uma sequência de repetições tandem que medeia a ligação ao DNA. A CRISPR/Cas9 (C) é formada por uma nuclease Cas9 e pelo RNA-guia, cuja sequência de 20 nucleotídeos estabelece o local de corte. Adaptado de S. Tong, E. J. Fine, Y. Lin, T. J. Cradick, and G. Bao, "Nanomedicine: Tiny particles and machines give huge gains," in *Annals of Biomedical Engineering*, 2014, vol. 42, no. 2, pp. 243–259, doi: 10.1007/s10439-013-0952-x.

5. Terapêuticas Aprovadas

5.1. Strimvelis

Strimvelis é um medicamento de terapia génica, com indicação para o tratamento de doentes com Imunodeficiência Combinada Grave causada pela deficiência de Adenosina Deaminase. É baseado na terapia génica *ex vivo*, recorrendo a um vector viral gamma retrovírus. Uma vez que, o número de doentes com ADA-SCID é reduzido e a doença é considerada rara, a 26 de Agosto de 2005, foi classificado pela EMA, como um medicamento orfão. É eficaz na melhoria da sobrevivência em doentes com ADA-SCID e em relação à segurança, foi relativamente bem tolerado, no entanto, os dados são limitados devido ao pequeno número de doentes estudados [159].

A Comissão Europeia concedeu uma AIM, válida para toda a União Europeia, para o *Strimvelis* a 26 de Maio de 2006, sendo o segundo medicamento de terapia génica, aprovado na União Europeia. O seu uso é autorizado em doentes cujo transplante de medula óssea não é possível, devido à falta de dador relacionado e compatível. O Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) da EMA, decidiu que, o *Strimvelis* tem benefícios superiores aos riscos e recomendou que fosse aprovado para uso na União Europeia. Segundo a EMA, “oferece a oportunidade de uma cura que melhora o funcionamento do sistema imunológico de doentes com ADA-SCID, uma condição com risco de vida” [159], [160].

A ADA-SCID é uma doença hereditária grave, na qual há alteração no gene que expressa para a enzima adenosina desaminase, resultando na falta desta enzima, e consequentemente na incapacidade de degradar adenosina e desoxiadenosina. Desta forma, há acumulação de metabolitos tóxicos de nucleótidos de purina, resultando na inibição da manutenção leucocitária e fenótipo de imunodeficiência combinada severa. Na falta da ADA, o sistema imunológico não funciona adequadamente e sem tratamento eficaz, os doentes raramente sobrevivem mais de 2 anos. Estima-se que ocorram 15 novos casos por ano, na Europa. O diagnóstico, por norma, é feito no início de vida, por triagem neonatal. O tratamento atual existente inclui o transplante alógeno de medula óssea com o dador compatível com HLA, com taxas de sucesso de cerca de 90 % (apenas quando o dador é um irmão ou membro da família). Outra abordagem terapêutica consiste na

terapia de reposição enzimática (sem aprovação na EU), com adenosina desaminase bovina peguilada (ADAGEN), que substitui a enzima que falta na corrente sanguínea, eliminando os metabolitos da purina. Após o tratamento inicial, a função imune é geralmente melhorada com aumento nos números absolutos linfócitos T e B circulantes, bem como linfócitos NK, mas estudos a longo prazo não demonstraram melhoria sustentada da função imune e os resultados permanecem abaixo do ideal, pois os doentes raramente conseguem atingir uma função imunológica normal. Além de alguns efeitos adversos associados como, o desenvolvimento de anticorpos para a ADA, o requisito de injeções contínuas, uma ou duas vezes por semana, tornam esta alternativa dispendiosa para doentes e familiares [159]–[161].

Recorrendo ao *Strimvelis*, o tratamento é personalizado para cada doente. Uma amostra das células estaminais hematopoiéticas da medula óssea do doente são extraídas e, de seguida, são extraídas células CD34+. Um gene ativo para a sequência de cDNA ADA é inserido nas células CD34+ recorrido a um vector retroviral, que foi alterado geneticamente. Aquando da administração na corrente sanguínea é transportado até para o osso da medula óssea, onde as CD34+ começam a crescer e a expressar para a enzima ADA, produzindo linfócitos. Os efeitos da administração são esperados que durem a vida inteira do doente [159].

Para além das vantagens associadas, requiere menos pré-tratamento que o transplante e diminui o tempo de procura de um dador compatível.

5.1.1- Eficácia e Segurança Clínica

A aprovação desta terapêutica foi feita com base num estudo com um total de 18 doentes com ADA-SCID, sendo que quatro indivíduos tinham recebido anteriormente um transplante mal sucedido de células estaminais de um doador compatível e 15 doentes tinham sido sujeitos a terapia de reposição enzimática com adenosina desaminase bovina modificada. Após a infusão, a presença do transgene levou ao aumento da expressão de ADA, sendo que a atividade da mesma permaneceu aumentada ao longo dos três anos seguintes. Os resultados mostram que os 18 doentes, até 13 anos após o tratamento, apresentam valores significativos de sobrevivência de 7 anos e, com incidência substancialmente reduzida de infeções oportunistas em relação à linha de base. Para além

disso, havia também evidências de aumento das células T e de aumento da timopoiese (*Figura 5.1*) [160].

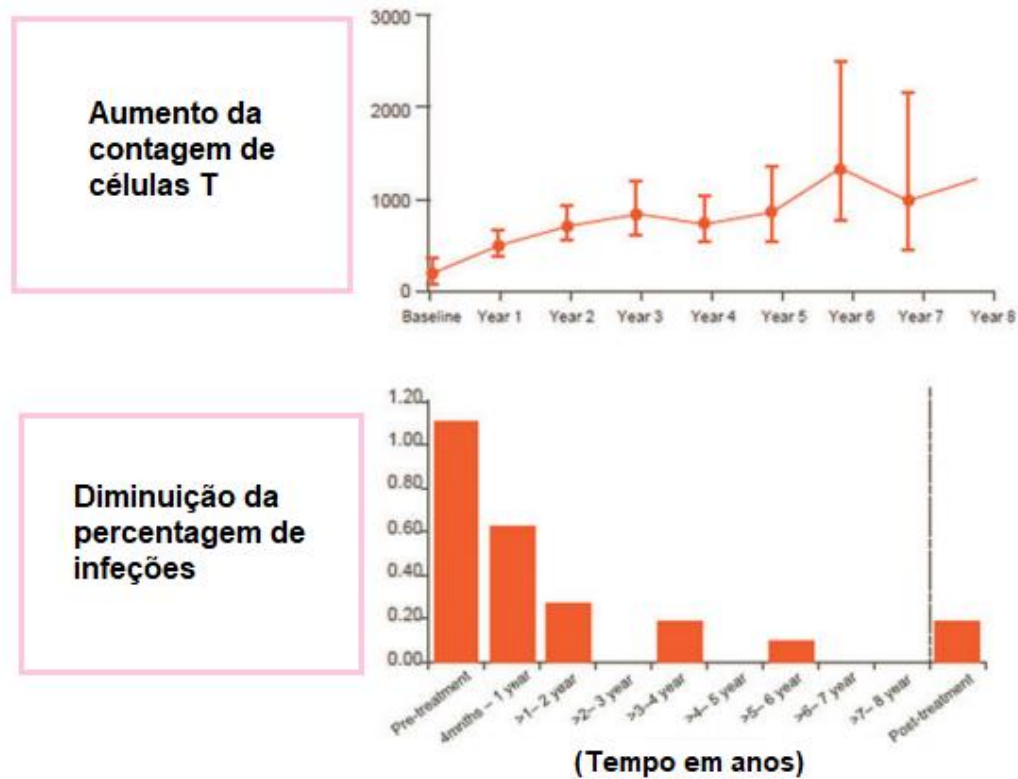


Figura 5.1 – Esquema representativo da eficácia de Strimvelis. No primeiro gráfico, é possível visualizar, evidências da reconstituição imunológica, com aumento das células T, em comparação com a linha de base antes do tratamento. A relação do aumento da contagem das células T e a diminuição das infeções, é consistente com uma melhoria geral da função imune. Adaptado de J. Schimmer and S. Breazzano, “Investor Outlook: Rising from the Ashes; GSK’s European Approval of Strimvelis for ADA-SCID,” Human Gene Therapy Clinical Development, vol. 27, no. 2. Mary Ann Liebert Inc., pp. 57–61, 01-Jun-2016, doi: 10.1089/humc.2016.29010.ind.

A ação de Strimvelis não foi estudada em doentes com idade superior a 65 anos e a segurança e eficácia em crianças com idade inferior a 6 meses e superior a 6 anos e 1 mês ainda não foi estabelecida [159][162].

5.1.2- Particularidades Clínicas

Na preparação do *Strimvelis* são recolhidas duas amostras da médula óssea do doente, uma para o fabrico do medicamento e outra de reserva – caso o fármaco não possa ser administrado, por falha no processo de fabrico, falha no transplante ou por aplasia prolongada da médula óssea após o tratamento- colhida cerca de 3 semanas antes do

tratamento, contendo pelo menos 1 milhão de células CD34+/kg. Um dos requisitos para a fabricação de *Strimvelis* é a capacidade do doente doar um número de células CD34+ suficientes para fornecer um mínimo de 4 milhões de células/kg [162].

Antes da administração, os doentes sujeitos ao *Strimvelis*, recebem um tratamento venoso preparatório com bussolfano, 0,5 mg/kg de 6h em 6h, durante dois dias (começando 3 dias antes da administração do *Strimvelis*), de forma a eliminar as células anormais da médula óssea e de anti-histamínico, imediatamente antes do tratamento, de forma a minimizar o risco de reações alérgicas. A dose do bussolfano pode ser reduzida, conforme a AUC. A administração de um anti-histamínico também é recomendada cerca de 15-30 minutos antes da infusão do *Strimvelis* [159], [162].

A sua administração é feita por infusão venosa durante cerca de 20 minutos, sendo que a dose administrada depende do peso corporal do doente. A dose recomendada é entre 2 a 20 milhões de células CD34+/kg, administração única, cuja taxa de infusão não deve ser superior a 5 mL/kg/h. Após a administração deve sempre ser usada seringa com solução salina 50 mL para fazer a lavagem da embalagem. Após a administração, é necessário fazer uma monitorização quanto à ocorrência de infeções graves e oportunistas [159][162].

Este tratamento destina-se exclusivamente a uso autólogo e nunca deve ser administrado a nenhum doente que não o doador de células original. Deve ser usado com cuidado em doentes com histórico de hipersensibilidade a aminoglicosídeos ou albumina do soro bovino.

Dada a pequena população de doentes aos quais se podem avaliar, os efeitos adversos apresentados não fornecem uma perspetiva completa sobre a natureza e frequência dos mesmos. Os efeitos adversos principais associados à administração de *Strimvelis* incluem pirexia (afeta 1 em cada 10 doentes). Os efeitos adversos graves podem incluir efeitos relacionados com reações imunológicas, anemia hemolítica, anemia aplástica, hepatite, trombocitopenia e síndrome Guillan-Barré [159], [162].

Como é um medicamento produzido com recurso a um vector viral, existe risco potencial de mutações não intencionais no material genético. No entanto, não há casos registados que tal tenha acontecido. Porém, locais de inserção retroviral foram detetados adjacentes ou no gene *LMO2*, estando relacionado com um risco de potencial

transformação leucêmica. Esta abordagem terapêutica não deve ser usada em doentes com leucemia ou mielodisplasia ou com histórico destas doenças, nem em doentes com resultado positivo para o HIV [159], [162].

5.1.3- Composição Qualitativa e Quantitativa

A forma farmacêutica apresentada é uma dispersão por infusão, nublada a clara, incolor a rosada. O produto acabado é acondicionado em sacos de acetato de etileno vinil (EVA) com uma fração celular enriquecida com células CD34+ autólogas e transduzidas com vetor retroviral que codifica para a sequência de cDNA de ADA humana. As informações quantitativas de células CD34+ por kg de peso do doente estão descritas na rotulagem de cada lote, sendo que a concentração é sempre de 1 a 10 milhões de células CD34+ por mL. Contém também excepiante, sódio, 0,15 mmol por mL [162].

5.2. Spinraza

O Spinraza (Nusinersen) é um oligonucleótido antisense (ASO), com capacidade para modificar a expressão do gene *SMN2*, aumentando a produção de proteína e resultando numa melhoria da função motora. Aprovado a 23 de Dezembro de 2016 pela FDA e em Junho de 2017 pela EMA, para o tratamento da Atrofia Muscular Espinhal, para doentes de todas as faixas etárias, independentemente do estadio da doença.

A atrofia muscular espinal (SMA) é uma doença neuromuscular hereditária, automossómica recessiva, que conduz a atrofia muscular progressiva e fraqueza. Afeta cerca de 1 em cada 11000 pessoas e é uma das principais causas genéticas de mortalidade infantil precoce, sendo que não existe cura. A sua etiologia está relacionada com deleções ou mutações no gene do neurónio de sobrevivência motora 1 (SMN1), um dos dois genes que codifica para a proteína SMN, localizada no cromossoma 5q13.2. A proteína codificada pelo gene *SMN* é fundamental para a manutenção e sobrevivência das células nervosas que controlam os músculos. Doentes com SMA tipo 1, com expectativa de vida de 2 anos, produzem pouca quantidade da proteína SMN. As formas da doença, do tipo 2 e 3, intermediária e leve, produzem maiores quantidades de SMN [163], [164].

Uma cópia quase idêntica do gene *SMN1*, o *SMN2*, faz parte do genoma humano e atua como um sistema de reserva com capacidade de produzir baixas quantidades da proteína SMN. Normalmente, doentes com SMA possuem duas ou mais cópias do gene *SMN2*, melhorando assim o fenótipo da doença. No entanto, como a quantidade de proteína formada é reduzida, estas cópias não são suficientes para retardar a gravidade da doença. O *Spinraza*, consiste numa pequena sequência de material genético sintético direcionado para o produto do gene *SMN2*, fazendo com que se gere maior quantidade da proteína SMN funcional [163].

O *Nusinersen* aumenta a inclusão do exão 7 em transcrições de mRNA do gene *SMN2* pela ligação do ASO a um local de splicing, que se encontra no intrão 7 do pré-mRNA do *SMN2*. Ao ligar-se, o ASO desloca os fatores de splicing que normalmente suprimem o splicing. O deslocamento destes fatores leva à retenção do exão 7 no mRNA do *SMN2* e, por consequência, pode ser traduzido numa proteína funcional de SMN de extensão total.

5.2.1- Eficácia e Segurança Clínica

A segurança e eficácia do medicamento foi relatada em vários estudos, incluindo um ensaio com um *follow up* de 14 meses após a injeção, mostrando melhorias estatisticamente significativas na função motora, sendo que uma melhoria da função motora mais pronunciada aparenta estar relacionada com menor gravidade da doença na linha de base [164][165].

Um estudo com doentes sintomáticos, conduzido em 121 lactentes com ≤ 7 meses de idade, foi realizado para avaliar o efeito de *Spinraza* na função motora e na sobrevida. Os doentes foram aleatorizados para receberem *Spinraza* ou o controle. Observaram-se efeitos significativos na sobrevida global e na proporção de doentes que atingiram a definição de respondedor de uma etapa motora (51%). A maioria dos doentes tratados com *Spinraza* apresentou estabilização ou melhoria na função motora, com o maior benefício observado naqueles com início do tratamento mais precoce [166].

5.2.2- Particularidades Clínicas

O *Spinraza* está formulado para ser administrado sob via intratecal, por punção lombar, ou seja, diretamente no líquido cefalorraquidiano, atingindo assim os neurónios motores (durante 1 a 3 minutos). É recomendado que um volume de líquido cefalorraquidiano (LCR), equivalente ao volume de *Spinraza* a ser injetado, seja removido antes da administração [163][166].

O esquema terapêutico recomendado inclui quatro injeções, sendo que as três primeiras devem ser efetuadas em intervalos de 14 dias e, a quarta, 30 dias depois da terceira, seguidas de uma dose de manutenção a cada 4 meses. A dose recomendada é de 12 mg (5mL) por administração. Não existem dados disponíveis, até à data, relacionados com a eficácia a longo prazo, sendo a necessidade de continuar com a terapêutica, analisada individualmente [163], [166].

As principais reações adversas observadas englobam anomalias na coagulação e trombocitopenia, incluindo trombocitopenia aguda grave, para além de casos notificados de hidrocefalia comunicante, em doentes tratados no contexto de pós-comercialização.

6. Contexto Social e Económico

Com o avanço da terapia génica, o uso de genes como produto terapêutico, levantou algumas questões éticas, associadas, naturalmente, à preocupação sobre a segurança desta metodologia.

Atualmente, apenas é permitido a realização de terapia génica em células da linhagem somática. No entanto, algumas razões podem ser apontadas para a permissão da realização da terapia génica em células da linhagem germinativa. Por exemplo, iria melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados, pais e crianças, principalmente, pela cura de determinada patologia ou pela redução do risco da mesma. Este tipo de terapia levaria à redução da frequência de certas doenças na população e até, segundo algumas opiniões, poderia ser considerado não ético, impedir a sociedade de ter acesso a técnicas que pudessem aliviar o sofrimento consequente de patologias. No entanto, o risco da realização da terapia génica em células da linhagem germinativa, engloba, principalmente, a falta de informação sobre os potenciais efeitos adversos e efeitos *off-target* da mesma, nas gerações futuras, para além de que, a sua efectividade não está completamente comprovada. Para além disso, questões éticas relativamente a movimentos eugenistas são um dos principais riscos desta edição genómica. O abuso, tanto a nível governamental, político ou comercial, são riscos a ter em conta. A regulamentação internacional neste sentido, é uma necessidade da humanidade, de forma a evitar abusos e proteger o genoma humano. Os processos de regulamentação também são altamente debatidos sobre quais os profissionais a serem consultados para os mesmos e sobre o excesso regulamentação, para que não impeça o desenvolvimento e investigação [167]–[170].

A segurança da terapia génica é outra questão amplamente discutida, devido ao risco de inserção por mutagene insercional, risco de infeção, devido ao uso de vectores virais e risco de resposta imunogénica. Deste modo, é importante assegurar a segurança de qualquer tipo de protocolo ou ensaio clínico. A importância de modelos de estudo pré-clínicos adequados e da investigação contínua, deve ser enfatizada, para melhorar a inocuidade e garantir a estabilidade dos produtos terapêuticos. Assim, também é possível, indiretamente, melhorar a eficácia da transfeção, muitas vezes insuficiente para alcançar os objetivos terapêuticos [4], [167].

Os custos elevados da terapia génica, e dos protocolos clínicos associados, tornam difícil a sua implementação como método de rotina. Veja-se, por exemplo, os valores estimados do custo da terapêutica Luxturna: cerca de \$850 000. Os custos apresentados pela empresa que desenvolveu esta terapêutica, não incluem os custos de cirurgia, nem outros custos médicos. Os custos são baseados numa relação custo-benefício, que tem em atenção- não só o valor da terapêutica em si e ao que representa clinicamente, mas também no valor da mesma para os doentes e na melhoria da qualidade de vida dos mesmos. No entanto, o valor estimado não tem em conta subsídios governamentais, seguros, e condições asseguradas pela empresa produtora, como acomodação, por exemplo. Futuramente, espera-se que os custos associados à terapia génica possam diminuir, devido a melhorias e desenvolvimentos nas técnicas utilizadas. No entanto, quando as patologias em questão são consideradas doenças raras, o custo não é expectável que sofra alterações, devido ao reduzido número de população abrangida pela terapêutica. O debate sobre a justificação económica da terapia génica e sobre a capacidade dos sistemas de saúde assegurarem os custos das mesmas, torna difícil o reembolso e aprovações sobre estas terapêuticas. Como consequência dos custos associados, terapêuticas aprovadas, em terapia génica, na Europa, já foram descontinuadas, como, por exemplo, a Glybera. [4], [170], [171].

7. Conclusão

O estudo da interação da resposta a fármacos, de patologias e da variabilidade genética de cada indivíduo e a forma como cada tratamento pode ser otimizado com base no genoma não é um conceito recente. A sequenciação do genoma humano veio otimizar resultados e possibilitar o avanço da terapia génica, tanto que, o número de ensaios clínicos e terapêuticas aprovados nos últimos anos, tem aumentado, especialmente na Europa e nos EUA.

Atualmente, o benefício clínico da terapia génica é inegável, mesmo considerando algumas desvantagens associadas, como os efeitos adversos existentes ou os custos apresentados. No entanto, os resultados promissores conseguidos em doenças cujo prognóstico raramente aparentava ser positivo, aumenta a esperança da descoberta de tratamentos para patologias em que estes não existem e também a esperança de que a terapia génica não seja só uma terapia de recurso mas que se trate de uma terapêutica de primeira linha.

A edição do genoma, recorrendo a tecnologias como a TALEN ou a CRISPR/Cas9, mais recentemente, e a possibilidade de manipular o genoma de forma precisa, apesar da sua necessidade de optimização, veio aumentar a confiança na forma como a terapia génica pode influenciar as terapêuticas atuais.

Apesar de avanços relativamente a questões como diminuição da resposta imunitária apresentada e de efeitos adversos citotóxicos, melhoria da capacidade de transporte e da entrega específica, aumento da expressão regulada a longo prazo e a constante optimização da segunda e eficácia, necessitarem de ser efectuados, é seguro afirmar que a terapia génica tem capacidade de redefinir a medicina como a conhecemos e tornar-se, possivelmente, a solução para certas patologias.

8. Referências Bibliográficas

- [1] D. L. Hartl, *Essential Genetics- A Genomics Perspective*, 5ª Edição. Jones and Bartlett Publishers, 2011.
- [2] K. B. Kaufmann, H. Büning, A. Galy, A. Schambach, and M. Grez, “Gene therapy on the move,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 11, pp. 1642–1661, Nov. 2013, doi: 10.1002/emmm.201202287.
- [3] “Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use,” 2001.
- [4] E. D. Austin-Ward and C. Villaseca G, “La terapia génica y sus aplicaciones,” *Rev. Med. Chil.*, vol. 126, no. 7, pp. 838–845, Jul. 1998, doi: 10.4067/S0034-98871998000700013.
- [5] K. Wertz, Dorothy C., Flecher, John C, Berg, “Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and The Provision of Genetic Services,” Geneva, 1995.
- [6] M. Li and B. J. Snider, *Gene Therapy in Neurological Disorders*. Elsevier, 2018.
- [7] T. Wirth, N. Parker, and S. Ylä-Herttuala, “History of gene therapy,” *Gene*, vol. 525, no. 2, pp. 162–169, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.GENE.2013.03.137.
- [8] M. L. Edelstein, M. R. Abedi, J. Wixon, and R. M. Edelstein, “Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview,” *J. Gene Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 597–602, Jun. 2004, doi: 10.1002/jgm.619.
- [9] G. A. R. Gonçalves and R. de M. A. Paiva, “Gene therapy: advances, challenges and perspectives.,” *Einstein (Sao Paulo)*, vol. 15, no. 3, pp. 369–375, 2017, doi: 10.1590/S1679-45082017RB4024.
- [10] D. M. O’Connor and N. M. Boulis, “Gene therapy for neurodegenerative diseases,” *Trends Mol. Med.*, vol. 21, no. 8, pp. 504–512, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.molmed.2015.06.001.
- [11] S. Nimesh, *Gene Therapy Potential Applications of Nanotechnology*. Woodhead Publishing, 2013.
- [12] S. Ylä-Herttuala, “The Pharmacology of Gene Therapy,” *Mol. Ther.*, vol. 25, no. 8, pp. 1731–1732, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.07.007.
- [13] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, and M. R. Abedi, “Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update,” *J. Gene Med.*, vol. 20, no. 5, p. e3015, May 2018, doi: 10.1002/jgm.3015.
- [14] M. Collins and A. Thrasher, “Gene therapy: progress and predictions.,” *Proceedings. Biol. Sci.*, vol. 282, no. 1821, Dec. 2015, doi: 10.1098/rspb.2014.3003.
- [15] N. D. Zinder and J. Lederberg, “Genetic Exchange in Salmonella,” vol. 64, pp.

679–1952, 1952.

- [16] E. Hunter Szybalska and W. Szybalski, “Genetics of Human Cell Lines, IV. DNA-Mediated Heritable Transformation of a Biochemical Trait,” 1962.
- [17] E. H. Humphries and H. M. Temin, “Cell Cycle-Dependent Activation of Rous Sarcoma Virus-Infected Stationary Chicken Cells: Avian Leukosis Virus Group-Specific Antigens and Ribonucleic Acid,” *J. Virol.*, vol. 10, no. 1, pp. 82–87, 1972.
- [18] T. Friedmann, “A brief history of gene therapy,” *Nat. Genet.*, vol. 2, no. 2, pp. 93–98, Oct. 1992, doi: 10.1038/ng1092-93.
- [19] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - Centro de Saúde Pública Dr. Gonçalves Pereira, “Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, Doenças Rastreadas, Hiperargininemia.” [Online]. Available: <http://www.diagnosticoprecoce.org/doencas/Hiperargininemia.htm>. [Accessed: 27-Mar-2019].
- [20] D. B. Kohn, “Historical Perspective on the Current Renaissance for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 5, pp. 721–735, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.hoc.2017.06.006.
- [21] S. A. Rosenberg *et al.*, “Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 323, no. 9, pp. 570–578, Aug. 1990, doi: 10.1056/NEJM199008303230904.
- [22] B. Sibbald, “Death but one unintended consequence of gene-therapy trial,” *C. Can. Med. Assoc. J.*, vol. 164, no. 11, p. 1612, May 2001.
- [23] W.-W. Zhang *et al.*, “The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 29, no. 2, pp. 160–179, Feb. 2018, doi: 10.1089/hum.2017.218.
- [24] European Medicines Agency, “RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO Glybera.” [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glybera-epar-product-information_pt.pdf. [Accessed: 27-Mar-2019].
- [25] “Refusal of the marketing authorisation for Glybera (alipogene tiparvovec) Re/examination,” 2011. [Online]. Available: www.ema.europa.eu. [Accessed: 27-Mar-2019].
- [26] M. C. Canver, “Evaluation of the Clinical Success of Ex Vivo and In Vivo Gene Therapy,” *J. Young Investig.*, Jan. 2009.
- [27] C. Menck and A. Ventura, “Manipulando Genes em busca de cura: o futuro da terapia génica,” *Rev. USP*, no. 75, pp. 52–61, 2007.
- [28] R. C. Wilson and L. A. Gilbert, “The Promise and Challenge of *In Vivo* Delivery for Genome Therapeutics,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 376–382, Feb. 2018, doi: 10.1021/acscchembio.7b00680.

- [29] P. Tolstoshey, “Gene Therapy, Concepts, Current Trials and Future Directions,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 33, no. 1, pp. 573–596, Apr. 1993, doi: 10.1146/annurev.pa.33.040193.003041.
- [30] G. Gowing, S. Svendsen, and C. N. Svendsen, “Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders,” in *Progress in brain research*, 2017, pp. 99–132.
- [31] R. Goswami *et al.*, “Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle.,” *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 297, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00297.
- [32] European Medicines Agency, “RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO- Kymriah.”
- [33] European Medicines Agency, “RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO- ZALMOXIS.”
- [34] A. Sereniki, M. Aparecida, B. Frazão, and V. Ii, “A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos Alzheimer’s disease: pathophysiological and pharmacological features,” *Rev Psiquiatr Rs*, vol. 30, no. 1, 2008.
- [35] M. H. Tuszynski *et al.*, “A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease,” *Nat. Med.*, vol. 11, no. 5, pp. 551–555, May 2005, doi: 10.1038/nm1239.
- [36] D. Ibraheem, A. Elaissari, and H. Fessi, “Gene therapy and DNA delivery systems,” *Int. J. Pharm.*, vol. 459, no. 1–2, pp. 70–83, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.041.
- [37] J. R. Mendell *et al.*, “Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 18, pp. 1713–1722, Nov. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1706198.
- [38] “ZOLGENSMA® (onasemnogene abeparvovec-xioi).” [Online]. Available: <https://www.zolgensma.com/>. [Accessed: 29-Feb-2020].
- [39] European Medicines Agency, “Information Management Division Applications for new human medicines under evaluation by the Committee for Medicinal Products for Human Use,” 2019.
- [40] J. van Haasteren, S. C. Hyde, and D. R. Gill, “Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future.,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 18, no. 9, pp. 959–972, 2018, doi: 10.1080/14712598.2018.1506761.
- [41] J. Ali *et al.*, “Potential of Nanoparticulate Drug Delivery Systems by Intranasal Administration,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, no. 14, pp. 1644–1653, May 2010, doi: 10.2174/138161210791164108.
- [42] H. R. Costantino, L. Illum, G. Brandt, P. H. Johnson, and S. C. Quay, “Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects,” *Int. J. Pharm.*, vol. 337, no. 1–2, pp. 1–24, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.03.025.
- [43] M. I. Alam *et al.*, “Strategy for effective brain drug delivery,” *Eur. J. Pharm.*

- Sci.*, vol. 40, no. 5, pp. 385–403, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.003.
- [44] R. V. Deev *et al.*, “pCMV- *vegf165* Intramuscular Gene Transfer is an Effective Method of Treatment for Patients With Chronic Lower Limb Ischemia,” *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, vol. 20, no. 5, pp. 473–482, Sep. 2015, doi: 10.1177/1074248415574336.
- [45] S. Chira *et al.*, “Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors.,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 31, pp. 30675–703, Oct. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5169.
- [46] J. Yang, H. Liu, and X. Zhang, “Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers,” *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 4. Elsevier Inc., pp. 804–817, 2014, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.004.
- [47] N. B. Nardi, L. A. K. Teixeira, and E. F. Á. da Silva, “Terapia gênica,” *Cien. Saude Colet.*, vol. 7, no. 1, pp. 109–116, 2002, doi: 10.1590/s1413-81232002000100010.
- [48] I. Trapani, A. Puppò, and A. Auricchio, “Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 43, pp. 108–128, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.08.001.
- [49] N. Hasan and S. Saini, “Gene therapy: Current status and future perspectives.”
- [50] K. Kamimura, T. Suda, G. Zhang, and D. Liu, “Advances in gene delivery systems,” *Pharmaceutical Medicine*, vol. 25, no. 5. Springer International Publishing, pp. 293–306, 01-Oct-2011, doi: 10.2165/11594020-000000000-00000.
- [51] N. Nayerossadat, P. Ali, and T. Maedeh, “Viral and nonviral delivery systems for gene delivery,” *Adv. Biomed. Res.*, vol. 1, no. 1, p. 27, 2012, doi: 10.4103/2277-9175.98152.
- [52] Y. Yamada, M. Tabata, J. Abe, M. Nomura, and H. Harashima, “In Vivo Transgene Expression in the Pancreas by the Intraductal Injection of Naked Plasmid DNA,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 107, no. 2, pp. 647–653, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.xphs.2017.09.021.
- [53] C. A. U. Heilmann, T. Attmann, A. Thiem, E. Haffner, F. Beyersdorf, and G. Lutter, “Gene therapy in cardiac surgery: intramyocardial injection of naked plasmid DNA for chronic myocardial ischemia☆,” *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 24, no. 5, pp. 785–793, Nov. 2003, doi: 10.1016/S1010-7940(03)00455-X.
- [54] T. Yokoo *et al.*, “Liver-targeted hydrodynamic gene therapy: Recent advances in the technique,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 40, pp. 8862–8868, Oct. 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i40.8862.
- [55] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider, “Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.,” *EMBO J.*, vol. 1, no. 7, pp. 841–845, Jul. 1982, doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.

- [56] X. Gao, K. S. Kim, and D. Liu, “Nonviral gene delivery: What we know and what is next,” *AAPS Journal*, vol. 9, no. 1. American Association of Pharmaceutical Scientists, 23-Mar-2007, doi: 10.1208/aapsj0901009.
- [57] J. Shi *et al.*, “A review on electroporation-based intracellular delivery,” *Molecules*, vol. 23, no. 11. MDPI AG, 21-Nov-2018, doi: 10.3390/molecules23113044.
- [58] S. Li, “Electroporation Gene Therapy: New Developments In Vivo and In Vitro,” *Curr. Gene Ther.*, vol. 4, no. 3, pp. 309–316, Nov. 2012, doi: 10.2174/1566523043346336.
- [59] C. Wan, F. Li, and H. Li, “Gene therapy for ocular diseases mediated by ultrasound and microbubbles (Review),” *Molecular Medicine Reports*, vol. 12, no. 4. Spandidos Publications, pp. 4803–4814, 01-Oct-2015, doi: 10.3892/mmr.2015.4054.
- [60] C. H. Fan, C. Y. Lin, H. L. Liu, and C. K. Yeh, “Ultrasound targeted CNS gene delivery for Parkinson’s disease treatment,” *Journal of Controlled Release*, vol. 261. Elsevier B.V., pp. 246–262, 10-Sep-2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.004.
- [61] M. Uchida, X. W. Li, P. Mertens, and H. O. Alpar, “Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1790, no. 8, pp. 754–764, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.013.
- [62] M. T. S. Lin, L. Pulkkinen, J. Uitto, and K. Yoon, “The gene gun: Current applications in cutaneous gene therapy,” *International Journal of Dermatology*, vol. 39, no. 3. Int J Dermatol, pp. 161–170, 2000, doi: 10.1046/j.1365-4362.2000.00925.x.
- [63] C. Plank, O. Zelphati, and O. Mykhaylyk, “Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 14–15. Adv Drug Deliv Rev, pp. 1300–1331, Nov-2011, doi: 10.1016/j.addr.2011.08.002.
- [64] C. Sapet, N. Laurent, L. Le Gourrierec, S. Augier, and O. Zelphati, “MagnétofectionTM in vitro et in vivo : Une voie vers la thérapie génique,” *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 68, no. 2, pp. 133–142, Mar. 2010, doi: 10.1684/abc.2010.0417.
- [65] T. Holzbach *et al.*, “Non-viral VEGF165 gene therapy - magnetofection of acoustically active magnetic lipospheres (‘magnetobubbles’) increases tissue survival in an oversized skin flap model,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 587–599, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00592.x.
- [66] T. Athanasopoulos, M. M. Munye, and R. J. Yáñez-Muñoz, “Nonintegrating Gene Therapy Vectors,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 5, pp. 753–770, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.hoc.2017.06.007.
- [67] C. Tros de Ilarduya, Y. Sun, and N. Düzgüneş, “Gene delivery by lipoplexes and polyplexes,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 40, no. 3. Eur J

- Pharm Sci, pp. 159–170, Jun-2010, doi: 10.1016/j.ejps.2010.03.019.
- [68] R. I. Zhdanov, O. V. Podobed, and V. V. Vlassov, “Cationic lipid-DNA complexes - Lipoplexes - For gene transfer and therapy,” *Bioelectrochemistry*, vol. 58, no. 1, pp. 53–64, 2002, doi: 10.1016/S1567-5394(02)00132-9.
- [69] S. Simões *et al.*, “Cationic liposomes for gene delivery,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 2, no. 2. Expert Opin Drug Deliv, pp. 237–254, Mar-2005, doi: 10.1517/17425247.2.2.237.
- [70] S. H. Pun and A. S. Hoffman, “Nucleic Acid Delivery,” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*, Elsevier Inc., 2013, pp. 1047–1054.
- [71] S. D. Li and L. Huang, “Gene therapy progress and prospects: Non-viral gene therapy by systemic delivery,” *Gene Therapy*, vol. 13, no. 18. pp. 1313–1319, Sep-2006, doi: 10.1038/sj.gt.3302838.
- [72] L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng, and N. He, “Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers,” *Theranostics*, vol. 4, no. 3. pp. 240–255, 2014, doi: 10.7150/thno.6914.
- [73] R. D. Jayant *et al.*, “Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 13, no. 10. Taylor and Francis Ltd, pp. 1433–1445, 02-Oct-2016, doi: 10.1080/17425247.2016.1188802.
- [74] O. Boussif *et al.*, “A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 16, pp. 7297–7301, Aug. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.16.7297.
- [75] S. Venkiteswaran, T. Thomas, and T. J. Thomas, “Selectivity of polyethyleneimines on DNA nanoparticle preparation and gene transport,” *ChemistrySelect*, vol. 1, no. 6, pp. 1144–1150, May 2016, doi: 10.1002/slct.201600026.
- [76] T. J. Thomas, H. A. Tajmir-Riahi, and C. K. S. Pillai, “Biodegradable polymers for gene delivery,” *Molecules*, vol. 24, no. 20. MDPI AG, p. 3744, 17-Oct-2019, doi: 10.3390/molecules24203744.
- [77] S. Patil *et al.*, “The development of functional non-viral vectors for gene delivery,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 21, Nov. 2019, doi: 10.3390/ijms20215491.
- [78] W. Walther and U. Stein, “Viral Vectors for Gene Transfer,” *Drugs*, vol. 60, no. 2, pp. 249–271, Aug. 2000, doi: 10.2165/00003495-200060020-00002.
- [79] B. J. Crenshaw, L. B. Jones, C. R. Bell, S. Kumar, and Q. L. Matthews, “Perspective on Adenoviruses: Epidemiology, Pathogenicity, and Gene Therapy,” *Biomedicines*, vol. 7, no. 3, p. 61, Aug. 2019, doi: 10.3390/biomedicines7030061.
- [80] A. R. Shaw and M. Suzuki, “Immunology of Adenoviral Vectors in Cancer Therapy,” *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, vol. 15. Cell Press, pp. 418–429, 13-Dec-2019, doi: 10.1016/j.omtm.2019.11.001.

- [81] C. Volpers and S. Kochanek, “Adenoviral vectors for gene transfer and therapy,” *J. Gene Med.*, vol. 6, no. S1, pp. S164–S171, Feb. 2004, doi: 10.1002/jgm.496.
- [82] H. A. Jaffe *et al.*, “Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver,” *Nat. Genet.*, vol. 1, no. 5, pp. 372–378, Aug. 1992, doi: 10.1038/ng0892-372.
- [83] D. J. Palmer and P. Ng, “Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy,” *Human Gene Therapy*, vol. 16, no. 1. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, pp. 1–16, 09-Jan-2005, doi: 10.1089/hum.2005.16.1.
- [84] A. N. Lukashev and A. A. Zamyatnin, “Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives,” *Biochemistry (Moscow)*, vol. 81, no. 7. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, pp. 700–708, 01-Jul-2016, doi: 10.1134/S0006297916070063.
- [85] J. L. Bramson, F. L. Graham, and J. Gauldie, “The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 6, no. 5, pp. 590–595, Jan. 1995, doi: 10.1016/0958-1669(95)80097-2.
- [86] T. Muhammad *et al.*, “Aloperine in combination with therapeutic adenoviral vector synergistically suppressed the growth of non-small cell lung cancer,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 146, no. 4, pp. 861–874, Apr. 2020, doi: 10.1007/s00432-020-03157-2.
- [87] “Subtipos do cancro do pulmão | CUF.” [Online]. Available: <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-pulmao/subtipos>. [Accessed: 31-Mar-2020].
- [88] M. F. Naso, B. Tomkowicz, W. L. Perry, and W. R. Strohl, “Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy,” *BioDrugs*, vol. 31, no. 4. Springer International Publishing, pp. 317–334, 01-Aug-2017, doi: 10.1007/s40259-017-0234-5.
- [89] S. Daya and K. I. Berns, “Gene therapy using adeno-associated virus vectors,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, no. 4. American Society for Microbiology Journals, pp. 583–593, 01-Oct-2008, doi: 10.1128/CMR.00008-08.
- [90] Z. Wu, A. Asokan, and R. J. Samulski, “Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy,” *Molecular Therapy*, vol. 14, no. 3. Cell Press, pp. 316–327, 01-Sep-2006, doi: 10.1016/j.ymthe.2006.05.009.
- [91] D. Wang, P. W. L. Tai, and G. Gao, “Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 18, no. 5. Nature Publishing Group, pp. 358–378, 01-May-2019, doi: 10.1038/s41573-019-0012-9.
- [92] C. H. Evans, S. C. Ghivizzani, and P. D. Robbins, “Arthritis Gene Therapy: A Brief History and Perspective,” in *Translating Gene Therapy to the Clinic: Techniques and Approaches*, Elsevier Inc., 2014, pp. 85–98.
- [93] L. Yin *et al.*, “AAV3-miRNA vectors for growth suppression of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and human liver tumors in a murine

- xenograft model in vivo,” *Gene Ther.*, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41434-020-0140-1.
- [94] M. Switonski, “Impact of gene therapy for canine monogenic diseases on the progress of preclinical studies,” *Journal of Applied Genetics*. Springer, 18-Mar-2020, doi: 10.1007/s13353-020-00554-8.
- [95] L. E. Mays *et al.*, “AAV8 induces tolerance in murine muscle as a result of poor APC transduction, T cell exhaustion, and minimal MHCI upregulation on target cells,” *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 1, pp. 28–41, Jan. 2014, doi: 10.1038/mt.2013.134.
- [96] D. Escors and K. Breckpot, “Lentiviral vectors in gene therapy: Their current status and future potential,” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 58, no. 2. pp. 107–119, Apr-2010, doi: 10.1007/s00005-010-0063-4.
- [97] L. S. Young, P. F. Searle, D. Onion, and V. Mautner, “Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application,” *J. Pathol.*, vol. 208, no. 2, pp. 299–318, Jan. 2006, doi: 10.1002/path.1896.
- [98] W. Walther and U. Stein, “Viral vectors for gene transfer: A review of their use in the treatment of human diseases,” *Drugs*, vol. 60, no. 2. Adis International Ltd, pp. 249–271, 2000, doi: 10.2165/00003495-200060020-00002.
- [99] M. C. Milone and U. O’Doherty, “Clinical use of lentiviral vectors,” *Leukemia*, vol. 32, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 1529–1541, 01-Jul-2018, doi: 10.1038/s41375-018-0106-0.
- [100] I. M. Verma and M. D. Weitzman, “GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 711–738, Jun. 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637.
- [101] A. Oehmig, C. Fraefel, and X. O. Breakefield, “Update on herpesvirus amplicon vectors,” *Molecular Therapy*, vol. 10, no. 4. pp. 630–643, Oct-2004, doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.641.
- [102] D. S. Latchman, “Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors,” *Gene*, vol. 264, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2001, doi: 10.1016/s0378-1119(01)00322-5.
- [103] R. H. Lachmann, “Herpes simplex virus-based vectors,” *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 85, no. 4. pp. 177–190, Oct-2004, doi: 10.1111/j.0959-9673.2004.00383.x.
- [104] S. Komaki and J. M. H. Vos, “Epstein-Barr virus vectors for gene therapy,” *Advances in Virus Research*, vol. 55. pp. 453–462, 2000, doi: 10.1016/s0065-3527(00)55012-x.
- [105] S. M. Stoll, C. R. Scimienti, E. J. Baba, L. Meuse, M. A. Kay, and M. P. Calos, “Epstein-Barr virus/human vector provides high-level, long-term expression of α 1-antitrypsin in mice,” *Mol. Ther.*, vol. 4, no. 2, pp. 122–129, Aug. 2001, doi: 10.1006/mthe.2001.0429.

- [106] D. Wang and G. Gao, “State-of-the-art human gene therapy: Part II. gene therapy strategies and clinical applications,” *Discov. Med.*, vol. 18, no. 98, pp. 151–161, 2014.
- [107] D. Gaudet, J. Méthot, and J. Kastelein, “Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency,” *Current Opinion in Lipidology*, vol. 23, no. 4. pp. 310–320, Aug-2012, doi: 10.1097/MOL.0b013e3283555a7e.
- [108] K. H. High, A. Nathwani, T. Spencer, and D. Lillicrap, “Current status of haemophilia gene therapy,” *Haemophilia*, vol. 20, no. S4. Blackwell Publishing Ltd, pp. 43–49, May-2014, doi: 10.1111/hae.12411.
- [109] M. M. Sleeper, “Status of Therapeutic Gene Transfer to Treat Cardiovascular Disease in Dogs and Cats,” *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, vol. 47, no. 5. W.B. Saunders, pp. 1113–1121, 01-Sep-2017, doi: 10.1016/j.cvsm.2017.04.005.
- [110] A. S. Barbosa and C. J. Lin, “Gene silencing with RNA interference: a novel tool for the study of physiology and pathophysiology of adrenal cortex,” *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, vol. 48, no. 5. pp. 612–619, 2004, doi: 10.1590/S0004-27302004000500005.
- [111] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*,” *Nature*, vol. 391, no. 6669, pp. 806–811, Feb. 1998, doi: 10.1038/35888.
- [112] D. Conte, L. T. MacNei, A. J. M. Walhout, and C. C. Mello, “RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 2015, pp. 26.3.1-26.3.30, 2015, doi: 10.1002/0471142727.mb2603s109.
- [113] M. T. McManus and P. A. Sharp, “Gene silencing in mammals by small interfering RNAs,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, no. 10. pp. 737–747, 01-Oct-2002, doi: 10.1038/nrg908.
- [114] Y. Deng *et al.*, “Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies,” *Gene*, vol. 538, no. 2. pp. 217–227, 01-Apr-2014, doi: 10.1016/j.gene.2013.12.019.
- [115] H. Kobayashi and Y. Tomari, “RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1859, no. 1. Elsevier, pp. 71–81, 01-Jan-2016, doi: 10.1016/j.bbagr.2015.08.007.
- [116] S. Niaz, “The AGO proteins: An overview,” *Biological Chemistry*, vol. 399, no. 6. Walter de Gruyter GmbH, pp. 525–547, 24-May-2018, doi: 10.1515/hsz-2017-0329.
- [117] D. D. Rao, J. S. Vorhies, N. Senzer, and J. Nemunaitis, “siRNA vs. shRNA: Similarities and differences,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 9. Elsevier, pp. 746–759, 25-Jul-2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.04.004.
- [118] S. Aguiar, B. van der Gaag, and F. A. B. Cortese, “RNAi mechanisms in Huntington’s disease therapy: SiRNA versus shRNA,” *Translational*

- Neurodegeneration*, vol. 6, no. 1. BioMed Central Ltd., 27-Nov-2017, doi: 10.1186/s40035-017-0101-9.
- [119] C. Nóbrega *et al.*, “Silencing Mutant Ataxin-3 Rescues Motor Deficits and Neuropathology in Machado-Joseph Disease Transgenic Mice,” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e52396, Jan. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0052396.
- [120] R. Y. Walder and J. A. Walder, “Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 14, pp. 5011–5015, Jul. 1988, doi: 10.1073/pnas.85.14.5011.
- [121] J. Kurreck, “Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 270, no. 8. pp. 1628–1644, Apr-2003, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x.
- [122] J. H. P. Chan, S. Lim, and W. S. F. Wong, “Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application,” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 33, no. 5–6. Blackwell Publishing, pp. 533–540, May-2006, doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x.
- [123] “Resumo Spinraza.” [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/spinraza-epar-summary-public_pt.pdf. [Accessed: 21-Apr-2020].
- [124] “Vitravene (Fomivirsen): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning.” [Online]. Available: <https://www.rxlist.com/vitravene-drug.htm#dosage>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [125] C. A. Stein and D. Castanotto, “FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017,” *Molecular Therapy*, vol. 25, no. 5. American Society of Gene and Cell Therapy, pp. 1069–1075, 03-May-2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.023.
- [126] S. T. Crooke, “Vitravene® - Another piece in the mosaic,” *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, vol. 8, no. 4. Mary Ann Liebert Inc., pp. vii–viii, Aug-1998, doi: 10.1089/oli.1.1998.8.vii.
- [127] S. L. Hutcherson and R. Lanz, “A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with aids,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 133, no. 4, pp. 467–474, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0002-9394(02)01327-2.
- [128] E. R. Rayburn and R. Zhang, “Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: Mission possible or impossible?,” *Drug Discovery Today*, vol. 13, no. 11–12. NIH Public Access, pp. 513–521, Jun-2008, doi: 10.1016/j.drudis.2008.03.014.
- [129] L. A. Couture and D. T. Stinchcomb, “Anti-gene therapy: the use of ribozymes to inhibit gene function,” *Trends Genet.*, vol. 12, no. 12, pp. 510–5, Dec. 1996, doi: 10.1016/s0168-9525(97)81398-4.
- [130] S. M. Sullivan, “Development of ribozymes for gene therapy,” in *Journal of Investigative Dermatology*, 1994, vol. 103, no. 5 SUPPL., pp. S85–S89, doi: 10.1038/jid.1994.15.

- [131] C. R. Ireson and L. R. Kelland, “Discovery and development of anticancer aptamers,” *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 5, no. 12. pp. 2957–2962, Dec-2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0172.
- [132] S. M. Nimjee, R. R. White, R. C. Becker, and B. A. Sullenger, “Aptamers as Therapeutics,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 57, no. 1, pp. 61–79, Jan. 2017, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558.
- [133] EMA, “Macugen, INN- pegaptinib sodium.” [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/macugen-epar-product-information_pt.pdf. [Accessed: 15-Feb-2020].
- [134] M. L. Maeder and C. A. Gersbach, “Genome-editing technologies for gene and cell therapy,” *Molecular Therapy*, vol. 24, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 430–446, 01-Mar-2016, doi: 10.1038/mt.2016.10.
- [135] R. O. Bak, N. Gomez-Ospina, and M. H. Porteus, “Gene Editing on Center Stage,” *Trends in Genetics*, vol. 34, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 600–611, 01-Aug-2018, doi: 10.1016/j.tig.2018.05.004.
- [136] T. Doetschman and T. Georgieva, “Gene Editing with CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease,” *Circulation Research*, vol. 120, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 876–894, 03-Mar-2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309727.
- [137] G. Donoho, M. Jasin, and P. Berg, “Analysis of Gene Targeting and Intrachromosomal Homologous Recombination Stimulated by Genomic Double-Strand Breaks in Mouse Embryonic Stem Cells,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 7, pp. 4070–4078, Jul. 1998, doi: 10.1128/mcb.18.7.4070.
- [138] F. Paques and P. Duchateau, “Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy,” *Curr. Gene Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 49–66, Feb. 2007, doi: 10.2174/156652307779940216.
- [139] S. Arnould *et al.*, “The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy,” *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 24, no. 1–2. pp. 27–31, Jan-2011, doi: 10.1093/protein/gzq083.
- [140] G. Silva *et al.*, “Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy,” *Curr. Gene Ther.*, vol. 11, no. 1, pp. 11–27, Feb. 2011, doi: 10.2174/156652311794520111.
- [141] H. Lisa Li, T. Nakano, and A. Hotta, “Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications,” *Development Growth and Differentiation*, vol. 56, no. 1. pp. 63–77, Jan-2014, doi: 10.1111/dgd.12107.
- [142] B. L. Stoddard, “Homing endonucleases: From microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification,” *Structure*, vol. 19, no. 1. NIH Public Access, pp. 7–15, 12-Jan-2011, doi: 10.1016/j.str.2010.12.003.
- [143] H. Puchta and F. Fauser, “Synthetic nucleases for genome engineering in plants: Prospects for a bright future,” *Plant Journal*, vol. 78, no. 5. Blackwell Publishing Ltd, pp. 727–741, Jun-2014, doi: 10.1111/tpj.12338.

- [144] D. Carroll, “Genome engineering with zinc-finger nucleases,” *Genetics*, vol. 188, no. 4, pp. 773–782, Aug. 2011, doi: 10.1534/genetics.111.131433.
- [145] D. B. T. Cox, R. J. Platt, and F. Zhang, “Therapeutic genome editing: Prospects and challenges,” *Nature Medicine*, vol. 21, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 121–131, 2015, doi: 10.1038/nm.3793.
- [146] F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, and P. D. Gregory, “Genome editing with engineered zinc finger nucleases,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, no. 9. Nat Rev Genet, pp. 636–646, Sep-2010, doi: 10.1038/nrg2842.
- [147] D. Carroll, “Progress and prospects: Zinc-finger nucleases as gene therapy agents,” *Gene Therapy*, vol. 15, no. 22. pp. 1463–1468, Nov-2008, doi: 10.1038/gt.2008.145.
- [148] H. Li *et al.*, “In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia,” *Nature*, vol. 475, no. 7355, pp. 217–221, Jul. 2011, doi: 10.1038/nature10177.
- [149] H. Yin, K. J. Kauffman, and D. G. Anderson, “Delivery technologies for genome editing,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 16, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 387–399, 01-Jun-2017, doi: 10.1038/nrd.2016.280.
- [150] H. Bi and B. Yang, “Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 149, Elsevier B.V., 2017, pp. 81–98.
- [151] K. D. Fink *et al.*, “Allele-specific reduction of the mutant huntingtin allele using transcription activator-like effectors in human huntington’s disease fibroblasts,” *Cell Transplant.*, vol. 25, no. 4, pp. 677–686, 2016, doi: 10.3727/096368916X690863.
- [152] C. A. Lino, J. C. Harper, J. P. Carney, and J. A. Timlin, “Delivering crispr: A review of the challenges and approaches,” *Drug Delivery*, vol. 25, no. 1. Taylor and Francis Ltd, pp. 1234–1257, 2018, doi: 10.1080/10717544.2018.1474964.
- [153] L. Xiao-Jie, X. Hui-Ying, K. Zun-Ping, C. Jin-Lian, and J. Li-Juan, “CRISPR-Cas9: A new and promising player in gene therapy,” *J. Med. Genet.*, vol. 52, no. 5, pp. 289–296, 2015, doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102968.
- [154] Q. Xiao, D. Guo, and S. Chen, “Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, no. MAR. Frontiers Media S.A., 2019, doi: 10.3389/fcimb.2019.00069.
- [155] H. Mollanoori and S. Teimourian, “Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy,” *Biotechnology Letters*, vol. 40, no. 6. Springer Netherlands, pp. 907–914, 01-Jun-2018, doi: 10.1007/s10529-018-2555-y.
- [156] A. M. Monteys, S. A. Ebanks, M. S. Keiser, and B. L. Davidson, “CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo,” *Mol. Ther.*, vol. 25, no. 1, pp. 12–23, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.010.
- [157] “CRISPR’d babies: human germline genome editing in the ‘He Jiankui affair’ . -

- PubMed - NCBI.” [Online]. Available:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31666967>. [Accessed: 22-Apr-2020].
- [158] M. Zhou *et al.*, “CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory,” *Elife*, vol. 5, no. DECEMBER2016, Dec. 2016, doi: 10.7554/eLife.20985.
- [159] CHMP, “Strimvelis, Common name - autologous CD34+ enriched cell fraction that contains CD34+ cells transduced with retroviral vector that encodes for the human ADA cDNA sequence.”
- [160] J. Schimmer and S. Breazzano, “Investor Outlook: Rising from the Ashes; GSK’s European Approval of Strimvelis for ADA-SCID,” *Human Gene Therapy Clinical Development*, vol. 27, no. 2. Mary Ann Liebert Inc., pp. 57–61, 01-Jun-2016, doi: 10.1089/humc.2016.29010.ind.
- [161] H. Stirnadel-Farrant *et al.*, “Gene therapy in rare diseases: The benefits and challenges of developing a patient-centric registry for Strimvelis in ADA-SCID,” *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 13, no. 1, p. 49, Apr. 2018, doi: 10.1186/s13023-018-0791-9.
- [162] CHMP, “Strimvelis, INN - autologous CD34+ enriched cell fraction that contains CD34+ cells transduced with retroviral vector that encodes for the human ADA cDNA sequence.”
- [163] V. Prakash, “Spinraza-a rare disease success story,” *Gene Therapy*, vol. 24, no. 9. Nature Publishing Group, p. 497, 01-Sep-2017, doi: 10.1038/gt.2017.59.
- [164] T. Hagenacker *et al.*, “Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study,” *Lancet Neurol.*, vol. 19, no. 4, pp. 317–325, Apr. 2020, doi: 10.1016/S1474-4422(20)30037-5.
- [165] E. Mercuri and V. Sansone, “Nusinersen in adults with spinal muscular atrophy: new challenges,” *Lancet Neurol.*, vol. 19, no. 4, pp. 283–284, Apr. 2020, doi: 10.1016/S1474-4422(20)30068-5.
- [166] EMA, “Spinraza, INN- nusinersen.” [Online]. Available:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spinraza-epar-product-information_pt.pdf. [Accessed: 22-Mar-2020].
- [167] T. Wirth, N. Parker, and S. Ylä-Herttuala, “History of gene therapy,” *Gene*, vol. 525, no. 2, pp. 162–169, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.gene.2013.03.137.
- [168] “Germ line genome editing in clinics: the approaches, objectives and global society.” [Online]. Available:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291189/>. [Accessed: 01-May-2020].
- [169] E. Rodríguez Yunta, “TERAPIA GÉNICA Y PRINCIPIOS ÉTICOS,” *Acta Bioeth.*, vol. 9, no. 1, pp. 69–79, 2003, doi: 10.4067/s1726-569x2003000100007.
- [170] I. Van Dijke, L. Bosch, A. L. Bredenoord, M. Cornel, S. Repping, and S. Hendriks, “The ethics of clinical applications of germline genome modification: A systematic review of reasons,” *Human Reproduction*, vol. 33, no. 9. Oxford

University Press, pp. 1777–1796, 2018, doi: 10.1093/humrep/dey257.

- [171] V. Shukla, E. Seoane-Vazquez, S. Fawaz, L. Brown, and R. Rodriguez-Monguio, “The Landscape of Cellular and Gene Therapy Products: Authorization, Discontinuations, and Cost,” *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 30, no. 3, pp. 102–113, Sep. 2019, doi: 10.1089/humc.2018.201.