



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Mariana Assunção Santos Mendes

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Diana Marques, Dra. Diana Costa e Dra. Sónia Correia Alfar e Monografia intitulada “Terapia Génica em Doenças Cardiovasculares” sob a orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Mariana Assunção Santos Mendes

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Diana Marques, Dra. Diana Costa e Dra. Sónia Correia Alfar e Monografia intitulada “Terapia Génica em Doenças Cardiovasculares” sob a orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, Mariana Assunção Santos Mendes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2018305564, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Génica em Doenças Cardiovasculares” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 30 de agosto de 2023

Mariana Assunção Santos Mendes

(Mariana Assunção Santos Mendes)

## **Agradecimentos**

Quero agradecer aos meus pais, irmãos e restantes familiares.

Quero agradecer ao meu orientador Professor Doutor Luís Pereira de Almeida pela disponibilidade e atenção na realização deste trabalho.

Quero agradecer à equipa da Farmácia Nogueira Janeiro e, principalmente, às orientadoras Dra. Diana Marques e Dra. Diana Costa, pelo apoio prestado ao longo deste estágio e pela receção acolhedora.

À equipa do departamento de *Compliance* da Bluepharma® por terem esclarecidos todas as minhas dúvidas e por me terem deixado à vontade, o que me permitiu sentir parte da equipa.

Na realização desta monografia, queria agradecer aos professores que me acompanharam durante os 5 anos deste curso.

Por último, quero agradecer ao grupo de amigas que fiz neste curso e às velhas amigas da minha cidade.

A todos, muito obrigada.

## Índice

### Parte I

<b>Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária .....</b>	<b>6</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>7</b>
<b>I. Introdução .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Análise SWOT .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Pontos Fortes .....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Aplicação de conhecimentos adquiridos.....	9
2.1.2 Equipa.....	9
2.1.3 Localização/Heterogeneidade de Clientes .....	9
2.1.4 <i>Backoffice</i> .....	9
2.1.5 <i>Robot</i> .....	10
<b>2.2 Pontos Fracos .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Timidez e falta de confiança.....	10
2.2.2 Medicamentos manipulados.....	11
2.2.3 Receitas manuais e receitas estrangeiras .....	11
2.2.4 Erros de <i>stock</i> .....	11
2.2.5 Dificuldade de associação entre a Designação Comum Internacional (DCI) e o nome das marcas .....	12
<b>2.3 Oportunidades.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Formações .....	12
<b>2.4 Ameaças.....</b>	<b>12</b>
2.4.1 Medicamentos esgotados .....	12
2.4.2 Plano curricular MICF .....	13
2.4.3 Acesso à informação dos utentes .....	13
<b>3. Casos Práticos.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>16</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>17</b>

### Parte II

<b>Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica .....</b>	<b>18</b>
<b>Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.....</b>	<b>18</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>19</b>
<b>I. Introdução .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Bluepharma.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Departamento de Compliance .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Análise SWOT.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Pontos Fortes .....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Receção, acolhimento e integração .....	21
4.1.2 Equipa.....	21
4.1.3 Metodologia <i>Kaizen</i> .....	22
4.1.4 Formações internas.....	22
4.1.5 Plano de estágio .....	23
4.1.6 Autonomia nas tarefas desempenhadas e confiança nos estagiários .....	24

<b>4.2 Pontos Fracos</b> .....	<b>24</b>
4.2.1 Duração do estágio.....	24
4.2.2 Tempo .....	24
<b>4.3 Oportunidades</b> .....	<b>25</b>
4.3.1 Experiência em Indústria Farmacêutica .....	25
4.3.2 Desenvolvimento de <i>soft skills</i> e domínio de <i>software Microsoft Teams</i> e <i>Microsoft Excel</i>	25
<b>4.4. Ameaças</b> .....	<b>26</b>
4.4.1 Crescente exigência e requisitos de qualidade/ <i>compliance</i> .....	26
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>27</b>
 <b>Parte III - Monografia “Terapia Génica em Doenças Cardiovasculares”</b>	
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>29</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>30</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>32</b>
<b>2. Terapia Génica</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 Adição de genes</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2. Silenciamento de genes</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3 Edição de genes</b> .....	<b>35</b>
<b>3. Doenças cardiovasculares</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Doenças cardíacas hereditárias</b> .....	<b>35</b>
3.1.1 Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (CPVT) .....	36
3.1.2 Cardiomiopatia hipertrófica .....	38
3.1.3 Deficiência familiar de lipoproteína lípase (LPLD).....	44
<b>3.2 Doenças cardiovasculares não monogénicas</b> .....	<b>49</b>
3.2.1 Indução da Angiogénese .....	49
3.2.2 Insuficiência cardíaca .....	52
3.2.3 Fibrilhação auricular.....	55
<b>4. Distrofia Muscular de Duchenne</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1 AAV na DMD</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2 Terapia Antissense em DMD</b> .....	<b>58</b>
<b>4.3 Edição de genes em DMD</b> .....	<b>58</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>59</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>61</b>

# Parte I

## Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Sob a orientação da Dra. Diana Marques e da Dra. Diana Costa

## **Lista de Abreviaturas**

**DCI** – Designação Comum Internacional

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MSNRM** – Medicamentos não Sujeitos a Receita Médica

**MSRM** – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

## I. Introdução

Ao longo do curso de Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas cada estudante tem acesso a formação teórica e prática. O objetivo de cada matéria e a sua respetiva aplicação é ajudar o estudante quando este inicia o estágio curricular e a sua vida profissional, preparando o aluno para aconselhar medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e dispensar medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), mantendo presentes, em todos os atendimentos, os efeitos adversos, mecanismos de ação e interações para, assim, ajudar o utente em todas as dúvidas que este possa ter. Além disso, as áreas de dermocosmética, ortopedia e suplementos também são importantes, por isso o aluno deve saber indicar adequadamente cada um destes produtos.

O Estágio Curricular na área de Farmácia Comunitária teve uma duração de 4 meses (janeiro a abril de 2023) e decorreu na Farmácia Nogueira Janeiro, localizada em Águeda, Aveiro, cuja proprietária e diretora técnica é a Dra. Margarida Brenha. Este estágio foi orientado pela Dra. Diana Marques, até março, e depois pela Dra. Diana Costa.

A equipa, na duração do meu estágio, era inicialmente constituída por 6 elementos, em que três eram farmacêuticas (Dra. Diana Marques, Dra. Diana Costa e Dra. Lia Miranda) e três eram técnicos de farmácia (Dra. Filipa, Dr. Ricardo e Dra. Catarina). De março a abril, a equipa diminuiu para 5 elementos, devido à saída da Dra. Diana Marques para outra área farmacêutica. O horário habitual da farmácia é das 9h às 20h, de segunda a sexta, e no sábado das 9h às 13h, exceto quando esta se encontra escalada para serviço.

O estágio, segundo o meu ponto de vista, teve duas fases. A primeira fase permitiu-me ter contacto com a logística do *backoffice* e com o sistema informático *Sifarma 2000*<sup>®</sup>, utilizado para dar entrada de encomendas. Depois de estar confortável com estes processos, iniciei o atendimento ao público.

Este relatório vai ser realizado tendo como base uma análise SWOT. Esta é constituída por uma análise interna, que aborda os pontos fortes e fracos, e uma análise externa, onde falarei sobre as oportunidades e ameaças.

## **2. Análise SWOT**

### **2.1 Pontos Fortes**

#### 2.1.1 Aplicação de conhecimentos adquiridos

Como referi acima, um dos objetivos do estágio é a aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de curso, através da formação sobre mecanismos de ação farmacológicos ou tecnológicos, efeitos adversos e interações, em disciplinas como Farmacologia, Farmacoterapia, Farmácia Clínica e Tecnologia Farmacêutica. A consolidação destas matérias em casos clínicos também contribuiu para um melhor aconselhamento ou dispensa de medicamentos, pela minha parte, quando um utente apresentava dúvidas.

#### 2.1.2 Equipa

A equipa era constituída por pessoal altamente qualificado, jovem e dinâmico. Outra característica importante era a entreatajuda entre os elementos, algo que permitiu que eu me sentisse facilmente integrada. Além disso, todos eles eram recetivos e mostraram-se disponíveis para responder a qualquer dúvida, tornando o estágio muito mais apelativo e fácil.

#### 2.1.3 Localização/Heterogeneidade de Clientes

A farmácia localiza-se na Av. Dr. Eugénio Ribeiro, que abrange várias lojas, cafés, zonas residenciais e ainda escolas. Por esse motivo, a afluência diária a esta farmácia era elevada, permitindo o contacto com vários tipos de clientes, desde os mais novos aos mais velhos e, conseqüentemente, com várias situações que exigiam uma abordagem diferente. Assim, nesta farmácia, podiam-se distinguir os clientes que já estavam fidelizados, daqueles que eram clientes pontuais. Ainda em relação a isto, uma vez que a localização era central, um dos pontos positivos foi o facto de ter tido contacto com muitos clientes estrangeiros.

#### 2.1.4 Backoffice

No *backoffice*, como referido anteriormente, era onde se fazia a gestão da farmácia. Dentro destas funções, incluem-se a receção de encomendas dos diferentes distribuidores e fornecedores, a gestão de *stocks*, a alteração de PVP's e a gestão de clientes.

Eu iniciei esta fase com a colocação dos produtos no robot para me familiarizar com os mesmos e com este sistema de armazenamento. Ao fazer isto, e como realizei um estágio de verão numa farmácia em que o armazenamento era feito em armários, conclui que o uso do robot contribui para um processo mais rápido e eficaz. Depois, nos dias seguintes, a equipa explicou-me como se procedia a receção de encomendas na farmácia. Eles trabalhavam, maioritariamente, com um distribuidor, responsável por entregar as encomendas diárias e as

instantâneas. Para esta função, tenho que referir a importância do meu estágio de verão, realizado no 3º ano, que contribuiu para a aquisição anterior de conhecimento sobre o *Sifarma 2000*®, tornando o processo mais fácil e fluído.

Neste âmbito, aprendi a realizar notas de devolução para aqueles produtos que tinham a validade expirada, que estavam danificados ou que tivessem vindo por engano dos distribuidores. Além disso, uma vez que a Farmácia Nogueira Janeiro pertencia a um grupo de 3 farmácias, a equipa ensinou-me a fazer guias de transporte para a transferência de produtos pedidos pelas outras farmácias.

Em contexto de *backoffice* tratei, ainda, das reservas. As reservas, usualmente, vinham incluídas nas encomendas instantâneas que se rececionavam no *backoffice*, no sistema *Sifarma 2000*®. Depois de rececionadas, verificava-se os papeis das reservas que estavam guardados e separavam-se os produtos de acordo com a seguinte classificação: reservas faturadas e não faturadas. Em ambas as situações, eram disponibilizados os produtos no *backoffice* e, depois, as reservas faturadas guardavam-se na zona do atendimento, em gavetas específicas para isso, e as reservas não faturadas armazenavam-se na parte de trás. Esta estratégia permitia, no caso das reservas não faturadas, a devolução aos fornecedores, caso o cliente não quisesse os produtos, uma vez que estes não tinham sido dispensados e, conseqüentemente, não se tinha picado o *datamatrix*.

### 2.1.5 Robot

O *robot* é importante para o funcionamento desta farmácia, pois permite uma gestão mais eficaz do armazenamento e dos prazos de validade. Este equipamento armazena os produtos de acordo com o seu tamanho, registando a data de validade automaticamente, se a caixa tiver *datamatrix*, ou de forma manual, como acontecia em muitos MNSRM. Desta maneira, é possível perceber melhor quais as necessidades da farmácia, em relação ao *stock*. O *robot* também contribui para um melhor atendimento, pela parte do farmacêutico, porque possibilita a maximização do tempo e a minimização dos erros. Isto permite uma melhor interação com o cliente, ajudando a entender as necessidades do mesmo e a prestar um melhor aconselhamento.

## **2.2 Pontos Fracos**

### 2.2.1 Timidez e falta de confiança

Neste relatório, tenho que destacar a timidez e a falta de confiança com que realizei este estágio. Apesar de termos tido acesso a vários conteúdos teóricos ao longo do curso, a aplicação na prática torna-se difícil, devido à rapidez e agilidade que são necessárias perante

um atendimento ou aconselhamento. Assim, em todos eles, estava presente o medo de errar e colocar em causa a saúde do utente e o nome da farmácia onde estagiei. Por esta razão, tenho que agradecer, mais uma vez, à paciência da equipa que esteve sempre disposta a esclarecer as minhas dúvidas, sem julgamentos, e com segurança. Ao mesmo tempo, sinto que esta incerteza afetou o meu estágio, porque, em diversas situações, interrompi o processo de atendimento dos meus colegas ou algumas tarefas que estavam a ser realizadas por eles.

### 2.2.2 Medicamentos manipulados

A Farmácia Nogueira Janeiro tem um laboratório, contudo já não produz medicamentos manipulados. Por isso, considero este um ponto fraco, uma vez que não contactei com este serviço farmacêutico.

### 2.2.3 Receitas manuais e receitas estrangeiras

No meu estágio, deparei-me com muitas receitas manuais que, inicialmente, se tornavam difíceis de processar. Na minha opinião, estas incluem-se neste ponto, devido à dificuldade de interpretação do que está escrito nelas, o que pode induzir em erro. Além disso, contactei com receitas que não cumpriam todos os requisitos das receitas manuais, impedindo o acesso à participação pela parte do doente.

Atualmente, com a maior taxa de imigração e com a escassez de serviços de saúde, encontramos na farmácia muitos estrangeiros com receitas supostamente emitidas por médicos residentes no seu país. No entanto, em várias situações, a receita era apenas um papel, onde estava escrito o nome do medicamento ou do princípio ativo, na língua materna do cliente. Por este motivo, a interpretação era difícil e como não eram receitas prescritas oficialmente, por médicos pertencentes à ordem nacional, havia algumas dúvidas sobre a maneira correta de agir.

### 2.2.4 Erros de stock

Na farmácia onde estagiei, havia registos de *stock* de todos os produtos disponíveis para venda que pode ser verificado no *Sifarma 2000*<sup>®</sup>. No entanto, em várias situações, os *stocks* encontravam-se errados e isto dificultava o atendimento ao cliente, uma vez que era necessário justificar a ausência de um produto, quando no sistema nos diz que ele existe. Além disso, isto causava vários constrangimentos na equipa, dado que tinham que resolver estes erros, no sistema informático.

## 2.2. 5 Dificuldade de associação entre a Designação Comum Internacional (DCI) e o nome das marcas

Um dos maiores obstáculos que surgiu foi associar os nomes comerciais ao princípio ativo. Apesar de, no final do estágio, este conhecimento ter aumentado, inicialmente era uma dúvida constante e, por isso, em várias situações, tive que recorrer ao restante da equipa para me esclarecerem sobre essa correspondência. Ao atendimento, em várias situações, tive que recorrer ao *Sifarma*<sup>®</sup> para perceber qual o princípio ativo do medicamento pedido, de maneira a prestar um melhor aconselhamento. Noutras situações, os clientes nem sabiam o nome do medicamento, mas sim a cor da caixa ou apenas a aparência do comprimido/cápsula. Nestes casos, a ficha do cliente poderia ser muito útil, no entanto, várias pessoas que entravam na farmácia eram clientes pontuais e, por isso, o processo tornava-se mais difícil.

## **2.3 Oportunidades**

### 2.3.1 Formações

Na minha opinião, uma das mais valias no estágio em farmácia comunitária é o acesso a formações de diferentes marcas de cosméticos, por exemplo. Tive oportunidade de assistir a uma formação da SVR<sup>®</sup>, via *zoom*, onde foram lembrados os produtos já existentes e apresentados os novos. Com esta formação, pude adquirir novos conhecimentos sobre uma matéria que não é muito abordada na faculdade.

Estas formações são, assim, importantes para que se obtenha um conhecimento aprofundado de produtos que podemos aconselhar aos utentes, tal como desenvolver técnicas de *cross-selling*, contribuindo para um melhor serviço farmacêutico.

## **2.4 Ameaças**

### 2.4.1 Medicamentos esgotados

Com o contexto atual, no meu estágio em farmácia comunitária, tive várias situações em que os clientes se dirigiam à farmácia com prescrições médicas, cujos medicamentos estavam esgotados em todos os fornecedores. Quando isto acontecia, a estratégia era ligar para as outras farmácias do grupo e perguntar se eles tinham o medicamento disponível no seu *stock*. Contudo, como esta situação é geral, muitas das vezes não era possível o envio do mesmo para a Farmácia Nogueira Janeiro. A grande dificuldade, que advinha desta situação, era explicar isto ao utente, sendo que alguns não conseguiam compreender e acreditavam que a culpa era da farmácia. A alternativa a estes casos era aconselhar um medicamento pertencente ao mesmo grupo homogéneo. Mesmo assim, algumas pessoas não se sentem confortáveis em

alterar o laboratório do medicamento e, por isso, preferem ficar sem a medicação. Isto não é benéfico, porque, muitas vezes, a medicação é crónica e indispensável.

#### 2.4.2 Plano curricular MICE

Com este estágio curricular, percebi que há uma falta de prática, ao balcão, no nosso curso. Nós temos, em muitas disciplinas, a parte teórico-prática, que nos permite realizar casos práticos. Contudo, falta-nos a interação com o público, porque nos casos práticos é-nos apresentada toda a informação necessária, enquanto no atendimento ao público temos que saber “jogar” com o cliente, de maneira a obter a informação necessária. Para isso, considero que seria importante haver maior acesso a estágios curriculares para, assim, colocar diariamente em prática, esta interação e os conteúdos teóricos aprendidos.

Além disso, reconheci que não tinha conhecimento suficiente sobre suplementos alimentares ou dispositivos médicos, assim como produtos de ortopedia.

#### 2.4.3 Acesso à informação dos utentes

Em vários casos, os utentes não se encontravam fidelizados na farmácia, mas vinham pedir aconselhamento sobre alguns produtos. A maior parte dos clientes não consegue transmitir a informação correta sobre a medicação que toma ou a patologia que tem, crónica ou não. Isto torna o aconselhamento difícil, porque não conseguimos distinguir as interações possíveis, nem os efeitos secundários que podem ter origem nestas. O mesmo pode acontecer com os clientes fidelizados. Por isso, considero que se deve trabalhar nisto para conseguir um melhor serviço farmacêutico, uma vez que estes profissionais de saúde, normalmente, têm uma proximidade maior com os utentes.

### **3. Casos Práticos**

#### **Caso Prático I**

Uma mulher, por volta dos 30 anos, grávida, foi à farmácia pedir aconselhamento, porque tinha dúvidas relacionadas com uma mancha vermelha na barriga. Quando ela chegou, explicou-me a sua dúvida e mostrou-me um produto que tinha na mão, que percebi ser Betnovate<sup>®</sup> pomada. A questão desta cliente relacionava-se com a mancha vermelha encontrada na barriga, a qual não conseguia perceber se era um eczema ou uma estria.

Perante observação da mancha, conclui que se tratava do eczema. Depois de relatar isto à utente, ela referiu que estas manchas eram frequentes e que, por isso, tinha trazido o Betnovate<sup>®</sup> para perceber se poderia continuar a usar durante a gravidez. Este produto

contém 1 mg de betametasona<sup>1</sup>, sob a forma de pomada. A betametasona é um corticosteróide de aplicação tópica, indicada para situações de dermatite atópica e eczema discoide<sup>1</sup>, por exemplo. Neste caso, como este produto tem uma quantidade limitada de resultados provenientes da utilização em gravidez, este não seria o mais aconselhado.<sup>1</sup>

Por esse motivo, apresentei-lhe uma alternativa: o Dexyane MED, um creme da marca Ducray<sup>®</sup>, que trata lesões de eczema, reparando e acalmando a zona afetada.<sup>2</sup> Este é um dispositivo médico que cuida e limita a recorrência de lesões de eczemas atópicos, de contacto e crónicos.<sup>2</sup> Uma das razões pelas quais eu recomendei este produto, deveu-se ao facto de este ser permitido usar em bebés e crianças.<sup>2</sup> Os bebés são os seres humanos mais sensíveis e, tendo em conta que o Dexyane MED pode ser utilizado neles, podemos concluir que este seria também um produto seguro para as mulheres grávidas. Além disso, o Dexyane MED contém indicações da ausência de cortisona e perfume<sup>2</sup> e, lembrando o motivo de não ter recomendado o Betnovate<sup>®</sup>, as cortisonas não têm estudos suficientes em mulheres grávidas, por este motivo devem ser evitadas.

## **Caso Prático II**

Uma rapariga, por volta dos 21 anos, deslocou-se à farmácia para pedir um aconselhamento sobre dores de garganta. Segundo a informação dada pela própria utente: 2 semanas antes deste acontecimento, ela tinha terminado um antibiótico, sobre o qual não consegui obter informação. No entanto, na semana em que este caso decorreu, ela voltou a sentir que a garganta se encontrava inflamada e, por isso, sentia dores.

A partir disto, tive de esclarecer que era impossível dispensar-lhe um antibiótico e que a única possibilidade, era vender-lhe umas pastilhas anti-inflamatórias para a garganta. Contudo, a utente referiu que isso nunca lhe era suficiente, o que me levou a questionar se as infeções da garganta eram recorrentes, à qual ela respondeu que sim. Depois disto, recordei-me de um produto que, nas aulas de Indicação Farmacêutica, relacionadas com o tema de Infeções Respiratórias, nos foi apresentado como sendo uma alternativa útil e mais forte aos anti-inflamatórios locais, designado de Hydrotricine<sup>®</sup>. Este produto é um MNSRM, cuja composição é de 1 mg de tirotricina, em forma de pastilhas.<sup>3</sup> A tirotricina é um princípio ativo indicado para o tratamento local tópico de infeções localizadas na mucosa bucal e orofaríngea.<sup>3</sup> Este é um antibiótico polipeptídico que vai atuar sobre os microrganismos responsáveis pelas afeções da boca e garganta, exercendo uma função inibidora e bactericida.<sup>3</sup> A forma farmacêutica deste produto permite um contacto mais forte da tirotricina com a mucosa bucal ou orofaríngea, levando a um efeito terapêutico mais rápido.<sup>3</sup>

Neste caso, o aconselhamento prestado foi a toma de 4 pastilhas por dia.<sup>3</sup> Mas sublinhei a importância de ir ao médico, caso a utente não note melhoria dos sintomas.

### **Caso Prático III**

Uma rapariga, perto dos 20 anos, dirigiu-se à farmácia e explicou-me que precisava de alguma coisa para a zona íntima, uma vez que, devido ao calor e transpiração, sentia que esta zona estava irritada e vermelha. Ela informou-me que tinha obtido Gino-Canesten<sup>®</sup>. Este é um MNSRM, cujo princípio ativo é o clotrimazol, um anti-fúngico que atua na *Candida*.<sup>4</sup> Assim, este produto é indicado para situações em que há candidíase vaginal recorrente, que é caracterizada por corrimento vaginal anormal, com uma cor branca, acompanhado de prurido vaginal.<sup>4</sup> Após questionar a utente, conclui que os únicos sintomas eram só a vermelhidão e, por esse motivo, não haveria necessidade de recorrer ao Gino-Canesten<sup>®</sup>. A alternativa recomendada, por mim, foi Halibut<sup>®</sup>, uma pomada constituída por óxido de zinco, que tem uma ação calmante, cicatrizante e regeneradora.<sup>5</sup> Este produto é, normalmente, usado nas dermatites da fralda<sup>5</sup>, por isso, a sua segurança já foi estudada. Além disso, a utente pediu aconselhamento sobre um gel de higiene íntima e, dado que a zona de aplicação se encontrava fragilizada, optei pelo Lactacyd<sup>®</sup> Pharma Sensitive, uma loção específica para zonas íntimas sensíveis e que irritam mais facilmente.<sup>6</sup> A razão da minha escolha baseia-se no facto deste produto ser clinicamente e dermatologicamente testado e pelo facto de não ter perfume<sup>6</sup>, o que é indicado para pessoas com uma maior sensibilidade.

Portanto, a minha indicação foi a lavagem da zona íntima com o gel e, no final do banho, a aplicação do Halibut<sup>®</sup> na zona irritada. Contudo, destaquei a importância de estar atenta aos sintomas, para perceber se houve alteração nos mesmos.

### **Caso Prático IV**

Um senhor, por volta dos 40 anos, dirigiu-se à farmácia para pedir um medicamento para a sua mulher, que apresentava sintomas de infeção urinária. A informação obtida, pelo cliente, é que a sua esposa tem infeções urinárias recorrentes e, por isso, queria saber se havia algum produto que poderia evitar o avanço da mesma. Como farmacêuticos comunitários, não podemos vender antibióticos e eu dei essa informação ao senhor. No entanto, recomendei-lhe o RoterCysti<sup>®</sup>, um medicamento tradicional à base de plantas utilizado no tratamento de sintomas de infeções ligeiras urinárias, constituído por um extrato de folhas *Arctostaphylos uva-ursi*.<sup>7</sup> A recomendação de dosagem é 2 comprimidos, 4 vezes ao dia.<sup>7</sup> Contudo, devido à *uva-ursi*, este não deve ser utilizado por mais de 4 dias.<sup>7</sup> Se no final dos 4 dias os sintomas não melhorarem ou piorarem, informei que a senhora deveria dirigir-se ao médico.<sup>7</sup>

## **Caso Prático V**

Um jovem, com 20 anos, veio à farmácia e pediu umas pastilhas para a dor de garganta para a sua irmã que tinha 7 anos. Inicialmente, o produto que me lembrei foi o Strepfen Mel e Limão®, cujo princípio ativo é o fluribprofeno.<sup>8</sup> Contudo, lembrei-me que este não poderia ser aconselhado a crianças com menos de 12 anos.<sup>8</sup> Por esse motivo, optei por uma alternativa: o ThymoTabs que pode ser aconselhado a crianças, grávidas e mães a amamentar.<sup>9</sup> Neste caso, a posologia deverá de ser 1 pastilha, 4 vezes ao dia.<sup>9</sup> A recomendação adicional foi que eles deveriam dirigir-se ao médico, caso não melhorassem.

## **4. Conclusão**

Estes 4 meses na Farmácia Nogueira Janeiro, foram o culminar de um processo de aprendizagem e desenvolvimento profissional e pessoal relativamente ao MICEF, no qual tive a oportunidade de colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de curso. No meu ponto de vista, o estágio curricular em Farmácia Comunitária é essencial, dado que só aqui é que conseguimos aliar a teoria à prática profissional.

Através desta experiência, foi-me permitido contactar com as diferentes atividades realizadas numa farmácia comunitária e, com isto, entendi que o papel do farmacêutico é mais complexo do que aquele que se fala diariamente. Em conclusão, o farmacêutico é, na sua essência, um agente da saúde pública, que contribui para a transmissão de informação sobre saúde, de uma maneira correta. Tendo em conta que este profissional está na “porta de entrada” para o SNS, é exigida uma enorme responsabilidade, competência e uma atualização constante de conhecimentos.

Termino, assim, este relatório, deixando um enorme agradecimento à equipa da Farmácia Nogueira Janeiro que, durante o meu estágio foram incansáveis no auxílio prestado e no esclarecimento das minhas dúvidas.

## 6. Bibliografia

1. INFARMED – **Resumo das características do medicamento.** Betnovate® 1 mg/g. [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
2. DUCRAY – **Dexyane MED, Creme reparador.** [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.ducray.com/pt-pt/p/creme-reparador-3282770073355-2a18b894>
3. INFARMED – **Resumo das características do medicamento.** Hydotricine®. [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
4. INFARMED – **Resumo das características do medicamento.** Gino-Canesten® creme vaginal. [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
5. INFARMED – **Resumo das características do medicamento.** Halibut®. [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
6. LACTACYD – **Lactacyd® Pharma Sensitive.** [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.lactacyd.pt/product/lactacydr-pharma-sensitive>
7. INFARMED – **Resumo das características do medicamento.** RoterCysti® [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
8. INFARMED – **Resumo das características do medicamento.** Strepfen Mel e Limão® [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
9. Tilman Portugal – **Thymotabs.** [Acedido a 4 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://tilmanportugal.com.pt/thymotabs/>

# **Parte II**

**Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

**Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.**



Sob a orientação da Dra. Sónia Correia Alfar e tutela  
da Dra. Carolina Simão Almeida

## **Lista de Abreviaturas**

**AIM** – autorização de introdução no mercado

**FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**ME** – materiais de embalagem

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**SOPs** – *Standard Operating Procedures*

**TDS** – *Technical Data Sheets*

## **I. Introdução**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), da Faculdade de Farmácia de Coimbra, possibilita aos estudantes a realização de um segundo estágio curricular noutra área do medicamento. Isto é vantajoso para os alunos, uma vez que lhes permite ter uma visão mais abrangente das saídas profissionais deste curso e experimentar áreas diferentes, com a finalidade de perceberem as suas preferências e aquelas em que se inserem melhor.

Neste sentido, decidi realizar um estágio curricular na área da Indústria Farmacêutica, uma vez que esta me suscitou interesse ao longo do curso. Com este objetivo, candidatei-me a um estágio na Bluepharma Indústria S.A., para o qual fui entrevistada e, posteriormente, selecionada. Este estágio ocorreu de 2 de maio a 28 de julho e foi realizado no Departamento de Compliance, em regime misto (presencial e teletrabalho), sob a orientação da Dra. Sónia Correia Alfar e tutela de Dra. Carolina Simão Almeida.

Para este relatório, darei, inicialmente, uma contextualização acerca da Bluepharma® e do departamento onde estive inserida, apresentando os seus conteúdos numa forma de Análise SWOT.

## **2. Bluepharma**

A Bluepharma® é uma empresa farmacêutica privada, sediada em Coimbra, na localidade de S. Martinho do Bispo, cuja missão é a investigação e o desenvolvimento de medicamentos, com um objetivo contínuo de garantir a qualidade dos processos de produção e comercialização, assim como a inovação dos mesmos.<sup>1</sup>

Esta empresa foi fundada em 2001, após aquisição da fábrica da Bayer®, em Coimbra.<sup>1</sup> Atualmente, o grupo Bluepharma® divide-se em 20 empresas inovadoras<sup>1</sup>, sendo que o meu estágio decorreu, como referido anteriormente, na Bluepharma Indústria, S.A. A empresa está presente em todas as etapas da cadeia de valor do medicamento, tendo um maior desenvolvimento nas seguintes áreas: produção de medicamentos para si próprios e para terceiros; investigação, desenvolvimento e o registo de medicamentos; e a comercialização de medicamentos genéricos.

## **3. Departamento de Compliance**

Ao longo dos 3 meses de estágio, estive inserida no Departamento de Compliance, no qual é gerido o ciclo de vida do medicamento, após obtenção de uma autorização de introdução no mercado (AIM). Neste departamento, analisa-se o impacto regulamentar que a documentação

de Fabrico e Analítica pode ter no lançamento de um medicamento para o mercado ou no dossier de AIM, assim como se procede à preparação e submissão das alterações regulamentares que sejam necessárias.

No meu caso, a área que me foi designada foi a regulamentar. Aqui, os gestores de processos regulamentares são responsáveis por determinadas moléculas e pelos seus clientes, com os quais têm que trabalhar para garantir que os processos de alterações são feitos corretamente e com a agilidade necessária. Além disso, os membros da equipa regulamentar também são responsáveis por fazer revisões de documentos internos da empresa e verificar se o *dossier* está em *compliance* com os mesmos, antes de algum lançamento.

## **4. Análise SWOT**

### **4.1 Pontos Fortes**

#### 4.1.1 Receção, acolhimento e integração

O estágio começou no dia 2 de maio com uma receção na sede da Bluepharma<sup>®</sup>, dirigida pelos Recursos Humanos. Nesta sessão descreveram a organização da empresa e as funções desempenhadas, de maneira geral, por cada departamento. No final, cada estagiário teve um tutor atribuído, cuja função era acompanhar-nos na fase inicial e ajudar-nos com as dúvidas que iam surgindo ao longo do tempo. Mais tarde, em outro momento, foi-nos permitido assistir a uma sessão de apresentação, ministrada pelo presidente da Bluepharma<sup>®</sup>, o Dr. Paulo Barradas Rebelo, na qual nos explicou a missão, a história, os valores e os projetos futuros da empresa.

Estas sessões, em conjunto com uma breve apresentação na reunião diária da equipa, permitiram que o nervosismo diminuísse.

#### 4.1.2 Equipa

Atualmente, a equipa do departamento da Compliance é constituída por vários colaboradores jovens, competentes, qualificados e com um elevado espírito de entreatajuda. Estas características, em conjunto com a disponibilidade para o esclarecimento das minhas dúvidas tornaram mais fácil as funções desempenhadas durante o meu estágio.

Desta maneira, o ambiente recetivo contribuiu para a minha integração na equipa e na realidade profissional de uma Indústria Farmacêutica.

#### 4.1.3 Metodologia Kaizen

Na Bluepharma<sup>®</sup>, é adotada a metodologia *Kaizen*, um termo japonês introduzido no mundo ocidental, que significa melhoria contínua. No caso da Indústria Farmacêutica, alguns obstáculos relacionam-se com a produtividade, a qualidade, a eficiência, a otimização de processos e a eliminação de processos que não têm valor adicional.

No Departamento de Compliance, estas reuniões realizam-se diariamente, de manhã, via *Microsoft Teams* e, têm, habitualmente, uma duração curta. Estas reuniões permitem o envolvimento de todos os colaboradores e permitem controlar e melhorar os resultados e indicadores da equipa, focando em diversos aspetos.

Aqui partilham-se as comunicações que cada colaborador acha que deve expor e que, normalmente, interferem com o trabalho de equipa, para, desta maneira, haver um acompanhamento diário e semanal por todos os membros do departamento. Além disso, preenchem-se parâmetros como problemas detetados e lições aprendidas, que são importantes para um bom trabalho de equipa.

Na duração do estágio, assisti a todas as reuniões *Kaizen* e, com estas, adquiri vários conhecimentos e consegui relacionar vários conceitos, assim como tive um ponto de vista mais realista do trabalho feito em Indústria Farmacêutica.

#### 4.1.4 Formações internas

A Bluepharma<sup>®</sup> é uma empresa que aposta muito na formação dos colaboradores, desde a sua entrada na empresa, de maneira a que estes adquiram as competências necessárias às funções desempenhadas. Para além disso, permite um conhecimento dos diferentes departamentos existentes e respetivas atividades, das medidas de segurança e orientação, tal como do funcionamento e das políticas da empresa.

Na primeira semana, assisti às sessões formativas encontradas na plataforma do *Success Factors*, que estavam relacionadas com a área em que eu iria estagiar, das quais se destacam: “SGI: Qualidade e GMP”, “Veeva Vault”, “Ambiente, Segurança e Saúde no Trabalho”, “Melhoria Contínua”, “Assuntos Regulamentares” e “Farmacovigilância”, que me permitiram consolidar conhecimentos já possuídos e que me ajudaram nas atividades realizadas durante o estágio.

Além disso, ao longo do estágio, foram-me ministradas formações pelos colaboradores do Departamento que me auxiliaram a contextualizar as funções, os princípios e os objetivos do departamento, assim como a compreender o modo de funcionamento da equipa. No meu caso, destaco a formação sobre a Organização da Documentação do Departamento de

Compliance, que está disponível numa plataforma *SharePoint*<sup>®</sup>, onde todos podem aceder, desde que tenham autorização para isso. Esta sessão foi importante, porque me ajudou a realizar as tarefas propostas.

Nas fases iniciais, foram-nos dadas SOPs (*Standard Operating Procedures*) para lermos, adequadas às funções que íamos desempenhar e para entender o funcionamento da empresa.

Assim, como referido acima, na Bluepharma<sup>®</sup> há uma preocupação com a formação contínua dos colaboradores que nos facilitou o processo de integração e o desempenho de tarefas.

#### 4.1.5 Plano de estágio

Depois de terminar as formações iniciais, foi-me apresentado o projeto em que eu estaria envolvida ao longo do estágio, o Projeto da Conformidade de materiais de embalagem (ME).

Durante estes meses, recorri a um documento Excel para recolher as especificações dos materiais de embalagem das moléculas existentes na empresa, com a finalidade de criar a “especificação ideal”. Para isto, analisei os dossiers de AIM dos clientes e comparei-os com um documento presente no *SharePoint*<sup>®</sup> (sistema interno de partilha e armazenamento de dados) para, assim, entender quais os clientes que se encontravam aprovados e quais as dosagens aprovadas para cada um deles. Esta “especificação ideal” teve como base o *worst case scenario* que, neste contexto, seriam os limites mais restritos, presentes nos dossiers.

O passo seguinte foi a consulta das TDS (*Technical Data Sheets*) que descrevem vários parâmetros dos materiais de embalagem, dos diferentes fornecedores. Nesta etapa, comparei a “especificação ideal” obtida dos dossiers com as TDS para selecionar os parâmetros em comum e, de seguida, criar, também, a “especificação ideal”. Neste caso, no entanto, os limites definidos teriam que englobar todos os fornecedores.

Depois de concluir estas fases, pediram-me para comparar os limites presentes no Excel dos dossiers com os que foram definidos no documento das TDS, cujo objetivo era avaliar a necessidade de alterações regulamentares do dossier. Para isto, tive que consultar a “*Guidelines on the details of the various categories of variations, on the operation of the procedures laid down in Chapters II, IIa, III and IV of Commission Regulation (EC) No 1234/2008 of 24 November 2008 concerning the examination of variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products for human use and veterinary medicinal products and on the documentation to be submitted pursuant to those procedures*”<sup>2</sup>, um documento oficial, que descreve os diferentes tipos de alteração (IA, IB ou II) e explica como se processam as submissões. No meu caso, o foco foi o “*Annex*”, onde estão classificadas as diferentes mudanças, no dossier, que os gestores podem encontrar, assim como a documentação a submeter à autoridade e as condições. Além disso,

para este trabalho, também tive que consultar o “Article 5”, um documento Excel, criado e atualizado pelas autoridades, que recolhem alterações que não estão tipificadas na *guideline* referida acima para auxiliar as empresas neste processo.

O projeto, em que estive envolvida, durou até ao final do meu estágio. Apesar disso, os colaboradores disponibilizaram-se, várias vezes, para nos mostrar e explicar outras tarefas que são da responsabilidade da equipa da Compliance. Por este motivo, considero que tive um acesso generalizado às funções desempenhadas por eles, algo que me ajudou a entender melhor o trabalho realizado nesta área.

#### 4.1.6 Autonomia nas tarefas desempenhadas e confiança nos estagiários

Ao longo do estágio, realizei algumas atividades que me iam sendo atribuídas, tal como referi anteriormente.

Devo destacar, então, a confiança que senti dos restantes colegas do departamento nas minhas capacidades, empenho e dedicação, assim como segurança para esclarecer as minhas dúvidas, à medida que elas iam surgindo.

## **4.2 Pontos Fracos**

### 4.2.1 Duração do estágio

Como foi referido anteriormente, a oportunidade de estagiar em Indústria Farmacêutica algo que deve ser considerado pelos alunos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, uma vez que é uma experiência enriquecedora e que nos ajuda a tomar decisões sobre o nosso futuro. Contudo, a duração do estágio, de 3 meses, é insuficiente, dado que servem apenas como uma breve contextualização das atividades realizadas nesta área.

Na minha opinião, a duração do estágio impede uma perceção mais detalhada, concreta e fundamentada da maneira como os conhecimentos adquiridos na faculdade podem ser aplicados à área de Indústria Farmacêutica, algo importante para aqueles que querem seguir este ramo.

No departamento de Compliance, isto tem um maior impacto, porque este departamento é essencial para o funcionamento da empresa. Aqui, são executadas imensas tarefas e existem um elevado número de procedimentos e conceitos inerentes que não são possíveis de assimilar ao longo dos 3 meses.

### 4.2.2 Tempo

Apesar de eu ter referido a disponibilidade dos colaboradores da empresa para esclarecerem as minhas dúvidas, senti que havia um grande compasso de espera entre elas e a obtenção das

respostas. Como referido acima, os colaboradores do departamento têm em suas mãos um elevado número de tarefas e, por isso, nem sempre havia disponibilidade imediata para responderem. Por este motivo, confesso que houve alturas em que me sentia frustrada, porque não conseguia avançar no meu trabalho, devido a essas dúvidas. Nestes momentos, tive várias horas, durante o dia, em que estava sem fazer nada, devido a isto.

### **4.3 Oportunidades**

#### 4.3.1 Experiência em Indústria Farmacêutica

Ao longo do meu percurso na FFUC, a Indústria Farmacêutica foi abordada por vários docentes e em várias disciplinas, tendo em conta que esta se encontra em crescimento e deve ser considerada como uma saída profissional pelos estudantes de MICE. Esta oportunidade permitiu-me absorver algumas das valências que um farmacêutico pode aplicar na indústria e, simultaneamente, compreender a realidade da Indústria Farmacêutica.

No contexto em que estive inserida, considero que, por exemplo, a unidade curricular de Assunto Regulamentares do Medicamento e a opcional do 5º Ano, Gestão de Processos Regulamentares, foram indispensáveis para obter conhecimentos sobre a área em que decorreu o meu estágio.

Assim, e como o estágio surge como uma etapa do percurso académico onde devemos consolidar os conhecimentos e como uma aprendizagem complementar, considero que me poderei tornar numa farmacêutica mais competente, versátil e proativa para a adaptação ao mundo de trabalho.

#### 4.3.2 Desenvolvimento de *soft skills* e domínio de *software Microsoft Teams e Microsoft Excel*

Nas atividades realizadas, utilizei algumas ferramentas, como o *Microsoft Excel*, com as quais ainda não estava muito confortável, devido ao pouco uso durante o meu percurso académico, ou o *Microsoft Teams*, um programa onde realizávamos as reuniões diárias do *Kaizen*.

Na verdade, para as funções desempenhadas, tive que consultar documentos Excel presentes no *SharePoint*® da *Bluepharma*® e criar outros documentos, referidos anteriormente.

Como *soft skills*, desenvolvi o trabalho em equipa, porque precisei de pedir ajuda aos diferentes colaboradores do departamento, o que me permitiu consolidar competências na sua utilização, assim como interpretar a informação organizada e sistematizada nestes locais. Além disso, contactei com o inglês, uma vez que a língua mais presente nos documentos é esta. Com este estágio, também desenvolvi o trabalho de equipa, uma vez que tive que contactar com os

diferentes colaboradores do departamento de Compliance e a gestão de tempo também foi uma característica adquirida neste estágio.

#### **4.4. Ameaças**

##### 4.4.1 Crescente exigência e requisitos de qualidade/compliance

Ao longo deste período, deu para perceber a crescente exigência e requisitos de qualidade/compliance que têm que ser cumpridos pelos diferentes colaboradores para que haja um bom funcionamento na empresa.

Isto implica a necessidade de uma comunicação clara e ativa, entre os vários departamentos e, também, entre a empresa e os vários clientes. No caso da área Regulamentar são necessárias alterações nos *dossiers*, que podem surgir dos clientes, das exigências da autoridade ou provenientes dos setores de produção e embalagem.

Estas exigências levam a uma sobrecarga nas atividades desenvolvidas e um aumento do volume de trabalho dos colaboradores.

#### **5. Conclusão**

Neste último ponto, há vários pontos a abordar e a analisar. Em primeiro lugar, destacar, de novo, a oportunidade dada pela FFUC em concretizar um estágio em Indústria Farmacêutica, algo que é fundamental para quem quer entrar nesta área ou obter um maior conhecimento sobre a mesma.

Além disso, com esta experiência, foi possível alargar os meus horizontes, no que diz respeito às saídas profissionais pelas quais eu, como futura farmacêutica, posso optar e compreender, de uma maneira geral, como é que o papel do farmacêutico pode ter impacto neste ramo, dado que apliquei os conhecimentos obtidos em unidades curriculares do MICF.

Relativamente à equipa do departamento da Compliance senti, desde o primeiro dia, o verdadeiro significado de trabalho em equipa e de espírito de *entreaajuda*. Devido ao trabalho desenvolvido, a competência e o profissionalismo de todos os colaboradores, consegui terminar o estágio com uma sensação de dever cumprido.

Resumidamente, considero que a Bluepharma® foi a escolha ideal para o meu estágio em Indústria Farmacêutica, porque é uma empresa recente que ainda se está a desenvolver e, por isso, os desafios aos quais assisti foram vários.

## **6. Bibliografia**

1. BLUEPHARMA – Empresa. [Acedido a 5 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharmagroup.com/pt/sobre-nos/empresa>
2. OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION – “Guidelines on the details of the various categories of variations, on the operation of the procedures laid down in Chapters II, IIa, III and IV of Commission Regulation (EC) No 1234/2008 of 24 November 2008 concerning the examination of variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products for human use and veterinary medicinal products and on the documentation to be submitted pursuant to those procedures”. [Acedido a 5 de agosto de 2023]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52013XC0802%2804%29>

# **Parte III**

## **Monografia**

### **“Terapia Génica em Doenças Cardiovasculares”**



Sob a orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida

## **Lista de Abreviaturas**

- AAV** – Vírus Adeno-associados
- Ad** – Vetores Adenovirais
- ADN** – Ácido Desoxirribonucleico
- AON** – Oligonucleótidos antissense
- AV** – Nódulo Auriculo-Ventricular
- AVC** – Acidentes Vasculares Cerebrais
- CASQ2** – Calsequestrina 2
- CPVT** – Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica
- CsA** – Ciclosporina A~
- DCV** – Doenças Cardiovasculares
- DMD** – Distrofia Muscular de Duchenne
- EMA** – Agência Europeia do Medicamento
- FA** – Fibrilhação Auricular
- gRNA** – guia de RNA
- HCM** – Cardiomiopatia Hipertrófica
- HEK293** – Células Embrionárias Renais
- IC** – Insuficiência Cardíaca
- IM** – Intramuscular
- ITR** – Repetições Invertidas Terminais
- KI** – *Knock – in*
- KO** – *Knock-out*
- LPL** – Lipoproteína Lipase
- LPLD** – Deficiência em Lipoproteína Lipase
- miRNAs** – micro RNA
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PMO** - Morfolino
- PPI** – Fosfatase I da proteína
- rAAV** – Vírus Adeno-associados Recombinantes
- RNA** – Ácido Ribonucleico
- RNAi** – RNA de interferência
- RYR2** - Recetor de Rianodina do tipo 2
- TG** – Triglicerídeos
- VE** – Ventrículo Esquerdo
- WT** – *Wild – type*

## **Resumo**

As Doenças Cardiovasculares (DCV), que se distinguem em doenças do coração e vasos sanguíneos, são patologias com uma elevada prevalência no mundo e em Portugal. Estas patologias são a maior causa de morte, a nível mundial, tendo-se registado 17,9 milhões de óbitos em 2019, de acordo com a OMS. Atualmente, as terapêuticas farmacológicas disponíveis baseiam-se em moléculas químicas, como bloqueadores adrenérgicos  $\beta$ , vasodilatadores arteriais ou venosos, os inibidores da enzima da conversão da angiotensina, entre outros, que atuam com o objetivo de controlar a sintomatologia da doença, e que, normalmente, não são suficientes para evitar as mortes súbitas provocadas por estas. Por isso, nesta monografia vou abordar diferentes modalidades de terapia génica, que recorrem, maioritariamente a vírus adeno-associados (AAV), e que têm sido apresentadas como uma alternativa ideal às pequenas moléculas para estas patologias para várias DCV hereditárias, como a Cardiomiopatia Hipertrófica, a Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica ou a Deficiência em Lipoproteína Lipase, ou DCV não monogénicas. Além disso, no mesmo documento, vou abordar a Distrofia Muscular de Duchenne, diagnosticada maioritariamente em homens, uma vez que esta doença hereditária progressiva vai afetar os músculos esqueléticos e cardíacos, levando à morte dos pacientes, ao fim do 1º ano de vida.

**Palavras-chave:** Doenças cardiovasculares, AAV, Terapia Génica, Cardiomiopatia Hipertrófica, Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica; Deficiência em Lipoproteína Lipase; Doenças não monogénicas; Distrofia Muscular de Duchenne

## **Abstract**

Cardiovascular Diseases (CVD), segmented in diseases of the heart and blood vessels, are pathologies with a high prevalence in the world and in Portugal. These pathologies are the leading cause of death worldwide, with 17.9 million deaths recorded in 2019, according to the WHO. Currently, available pharmacological therapies are based on chemical molecules, such as  $\beta$ -adrenergic blockers, arterial or venous vasodilators, angiotensin-converting enzyme inhibitors, among others, which act with the objective of controlling the symptoms of the disease, and which, normally, are not enough to avoid the sudden deaths caused by them. Therefore, in this monograph I will address different modalities of gene therapy, a lot of them using adeno-associated virus (AAV), which have been presented as an ideal alternative to small molecules for various hereditary CVDs, such as Hypertrophic Cardiomyopathy; Polymorphic Catecholaminergic Ventricular Tachycardia; Lipoprotein Lipase Deficiency; or Non-monogenic CVD. In addition, in the same document, I will address Duchenne Muscular Dystrophy, diagnosed mostly in men, since this progressive hereditary disease will affect the skeletal and cardiac muscles, leading to the death of patients, at the end of the 1st year of life.

**Keywords:** Cardiovascular Diseases; AAV; Gene Therapy; Hypertrophic Cardiomyopathy; Polymorphic Catecholaminergic Ventricular Tachycardia; Lipoprotein Lipase Deficiency; Non-monogenic CVD; Duchenne Muscular Dystrophy

## I. Introdução

As doenças mais prevalentes, a nível mundial, são as cardiovasculares que se distinguem em doenças do coração e dos vasos sanguíneos. Estas são a maior causa de morte, sendo que o último valor registado foi de 17,9 milhões de óbitos, em 2019, de acordo com a OMS.<sup>1</sup> Em Portugal, as doenças cardiovasculares (DCV) são muito prevalentes, registando-se anualmente, 35 000 mortes.<sup>2</sup> Estes números devem-se a vários fatores, nomeadamente a dietas pouco saudáveis, à falta de exercício físico, ao abuso de tabaco e álcool e a fatores genéticos.<sup>1</sup> Portanto, a eliminação dos primeiros ajudaria na redução do risco de desenvolvimento de DCV.<sup>1</sup>

Contudo, quando a terapia não farmacológica é insuficiente, tem que se recorrer a abordagens farmacológicas. Neste caso, as terapêuticas são muito variadas e fundamentam-se no processo fisiopatológico da doença em questão e no mecanismo de ação dos princípios ativos. Atualmente, nas doenças cardiovasculares recorre-se a fármacos como os bloqueadores dos canais de sódio, os bloqueadores adrenérgicos  $\beta$ , os vasodilatadores arteriais ou venosos, os inibidores da enzima de conversão da angiotensina, entre outros. Estas terapias, no entanto, são utilizadas apenas para controlar cada patologia, o que, conseqüentemente, pode melhorar a qualidade de vida do doente e diminuir a taxa de mortalidade causada por DCV. Apesar da evolução que tem ocorrido, o objetivo último ou “sonho” dos especialistas e investigadores é encontrar a cura para estas doenças, uma vez que a prevalência das DCV se mantém elevada. A terapia génica tem esse potencial curativo pelo que tem sido apresentada, em vários ensaios, como a alternativa ideal às pequenas moléculas.

Os medicamentos de terapia génica, são definidos pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), como sendo constituídos por genes, cujas finalidades podem ser de diagnóstico, terapêuticas ou profiláticas.<sup>3</sup> O seu mecanismo de ação baseia-se na introdução de genes recombinantes no organismo, com o objetivo de tratar doenças genéticas, oncológicas ou doenças crónicas<sup>3</sup>, como é o caso das patologias em questão.

Segundo Malech *et al.*,<sup>4</sup> o primeiro passo na terapia génica ocorreu quando Avery e os seus colaboradores concluíram que o ADN era a molécula responsável pelas diferenças identificadas entre as estirpes bacterianas.<sup>4</sup> De acordo com os mesmos autores, este fenómeno teve uma grande influência na descoberta da estrutura do ADN, por Watson e Crick, e mais tarde nos anos 70 com a descoberta da tecnologia de DNA recombinante<sup>4</sup> que impulsionou, ainda mais, a investigação nesta área.

## **2. Terapia Génica**

A terapia génica tem, essencialmente, três modalidades: adição de genes, silenciamento de genes e edição ou reparação de genes. Em relação à adição de genes, esta envolve a entrega dos ácidos nucleicos (DNA ou RNA) à célula e visa uma maior produção de proteína que está em falta ou que é atípica. Trata-se da abordagem de terapia génica mais simples e utilizada na maioria dos medicamentos de terapia génica atualmente aprovados.

No contexto do silenciamento de genes, há diferentes tecnologias: a interferência de RNA (RNAi) atua a nível pós-transcricional, porque suprime a expressão dos genes ao nível do mRNA, promovendo a degradação ou bloqueio da tradução do mRNA. Geralmente recorre à entrega de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) ou à expressão de shRNAs, em ambos os casos ativando o mecanismo de interferência de RNA. Os microRNAs (miRNAs), também relacionados com esta via são mais bem tolerados dada a sua natureza endógena de regulação de expressão génica. Apesar de na sua forma natural atuarem sobretudo por bloqueio da tradução, têm sido modificados para ativarem, da mesma maneira, o mecanismo de interferência de RNA e, desta forma, promoverem também a degradação do mRNA-alvo. Uma outra classe de moléculas que permite induzir o silenciamento de genes são os oligonucleótidos antissense. Trata-se de moléculas geradas por síntese química e como tal, em rigor, não são consideradas terapia génica pela definição da EMA, que apenas considera, nesta classe, moléculas produzidas por tecnologia de DNA recombinante. Dado o seu interesse e semelhança de atividade também vão ser abordados nesta monografia.

Por último, a edição ou reparação de genes recorre a nucleases bacterianas, como a CRISPR/Cas9, para alterar sequências genómicas que estejam modificadas nas patologias. Em qualquer destas modalidades de terapia génica, os ácidos nucleicos (RNA ou DNA) são protegidos e conduzidos às células alvo graças a vetores virais ou não virais.

### **2.1 Adição de genes**

Ao longo dos anos, a entrega de ácidos nucleicos ou genes às células alvo revelou-se desafiante devido às barreiras que estes têm de ultrapassar para chegarem ao interior das células alvo e, em muitos casos, ao seu núcleo, até os investigadores terem concluído que alguns vírus conseguiam ultrapassar essas barreiras.<sup>5</sup> Entre estes contam-se na classe dos vírus integrativos, os gama retrovírus e os lentivírus, enquanto nos vírus não integrativos, os mais utilizados são os adenovírus e os vírus adeno-associados. Atualmente, há diversos medicamentos aprovados, com esta tecnologia, tais como o Glybera, um produto utilizado em doentes com deficiência na lipoproteína lipase (LPL), e o Zolgensma para a atrofia muscular espinal de tipo I.<sup>4</sup> Apesar

disto, esta estratégia ainda não foi aprovada nas DCV que, como referido anteriormente, são muito impactantes na taxa de mortalidade.

Os vírus adeno-associados (AAV) pertencem à família dos *parvovirus* e são constituídos por uma cadeia simples de DNA, com os genes Rep e Cap precedidos e secundados por repetições invertidas terminais (ITR).<sup>4</sup> Estes vetores virais apresentam muitas vantagens, porque têm: elevada eficiência de infecção, baixa toxicidade, uma expressão robusta e muito baixo risco de inserção no genoma. Atualmente, recorrem-se a vírus adeno-associados recombinantes (rAAV), que tiveram uma parte do genoma viral substituída por uma carga genética de interesse.<sup>4</sup> Estes vetores apresentam, ainda, uma cápside, que tem uma grande influência na afinidade do AAV em relação a um tecido e também funciona como veículo.<sup>4</sup> Por isso, a modificação desta pode aumentar a seletividade cardíaca. Aqui, entram os 13 serotipos humanos e de primatas que foram descobertos, dos quais se destacam: AAV1, AAV6, AAV8 e AAV9, que são os mais cardiotrópicos.<sup>4</sup> Apesar do enorme potencial, a utilização dos AAV pode ser desafiante, devido à resposta imunitária do organismo, dado que a população mundial tem uma elevada prevalência de presença de anticorpos neutralizantes destes vírus, derivados da exposição natural do Homem a AAVs selvagens, que pode reduzir a eficiência da terapia com os vírus adeno-associados.<sup>4</sup>

## **2.2. Silenciamento de genes**

As vacinas contra a COVID-19 demonstraram que as terapêuticas de RNA podem ser estudadas, desenvolvidas e distribuídas muito rapidamente, apresentando perfis de eficácia e segurança muito favoráveis.

O mecanismo de RNAi, como referido anteriormente, apenas regula o mRNA na fase pós-transcricional e, adicionalmente, defende o organismo de ácidos nucleicos estranhos. Este processo pode ser ativado por siRNAs ou miRNAs, iniciando-se com o emparelhamento de bases e culminando na destruição do mRNA, o que tem como consequência a redução dos níveis de produção da proteína correspondente. Apesar disso, há algumas diferenças significativas entre os processos ativados por siRNAs e miRNAs. Os siRNA apresentam total complementaridade ao mRNA alvo e levam à sua degradação por um processo catalítico, recorrendo a cortes. Em contrapartida, a atividade dos miRNAs pode envolver a degradação do mRNA ou a repressão da tradução dependendo do grau de complementaridade entre o miRNA e o seu mRNA alvo. Os miRNAs endógenos ligam-se aos seus mRNAs alvo principalmente por meio de complementaridade de sequência parcial, enquanto os miRNAs concebidos para terapia génica têm complementaridade perfeita com o mRNA alvo. Nestas

situações, a complementaridade perfeita ou quase perfeita resulta na degradação do mRNA enquanto a complementaridade imperfeita se limita à repressão da tradução.<sup>6</sup>

Por outro lado, a outra estratégia utilizada para o silenciamento de genes, os oligonucleótidos antissense (AON), são moléculas pequenas, análogas aos ácidos nucleicos, produzidos por síntese química, complementares ao alvo celular do RNA.<sup>6</sup> Estes servem-se das interações entre bases, atuando das seguintes formas: interferindo no processamento do pré-mRNA; suprimindo a tradução ou induzindo a degradação dos alvos de mRNA. Por outras palavras, o local de ação dos AONs encontra-se na fase de pré-transcrição ou pós-transcrição.<sup>6</sup>

### **2.3 Edição de genes**

A enzima CRISPR/CAS9 é uma ferramenta adotada do Sistema Imunitário Adaptativo dos procariotas. O sistema CRISPR/Cas9 teve uma rápida evolução, com a alteração da enzima para criar uma ferramenta de edição, fundamentada na combinação da Cas9 e de guias de RNA que, por sua vez, são desenhadas para atingirem um alvo específico de DNA levando à indução duma clivagem simultânea das duas cadeias do DNA alvo.<sup>7</sup> A reparação do DNA por um mecanismo de junção não homóloga leva tipicamente à introdução de codões stop e à inativação do gene.<sup>7</sup> Por vezes, pode ser ativado um mecanismo de reparação dirigido por homologia e, na presença de um DNA molde, desta forma substituir-se a sequência onde foi introduzida a quebra pela sequência fornecida.<sup>7</sup> Mais recentemente, o sistema foi adaptado para a edição de bases<sup>8</sup>, o que possibilita a substituição de um único par de nucleótidos, no genoma, sem ser necessária a clivagem da molécula de DNA.

## **3. Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares são um conjunto de patologias do coração e dos vasos sanguíneos. Nestas situações, os eventos mais comuns são os enfartes e os acidentes vasculares cerebrais (AVC) que derivam, maioritariamente, de um bloqueio que impede a circulação do sangue para o cérebro ou coração. Nesta monografia, o foco vão ser as doenças cardíacas hereditárias, tratadas em primeiro lugar. Mas, adicionalmente, a terapia génica em doenças cardiovasculares não monogénicas também será abordada.

### **3.1 Doenças cardíacas hereditárias**

As doenças cardíacas hereditárias, são transmitidas aos filhos pelos genes dos pais<sup>9</sup> e são raras. Estas patologias devem-se a mutações num ou mais genes, em apenas num ou nos dois alelos. No caso de patologias dominantes têm 50% de possibilidade de serem transmitidas às gerações seguintes<sup>9</sup>. No caso de doenças recessivas a patologia apenas se manifesta quando é herdada

a mutação dos dois progenitores. As doenças cardíacas genéticas merecem atenção, porque podem ser fatais e nem sempre têm sintomas, sendo apenas descobertas quando ocorre uma morte súbita por causas cardíacas.<sup>9</sup> Alguns exemplos de patologias que afetam o coração são a taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica (CPVT) e a cardiomiopatia hipertrófica (HCM). Nestes casos, ainda se podem considerar doenças que afetam negativamente os vasos sanguíneos como a deficiência familiar em lipoproteína lipase.

### 3.1.1 Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (CPVT)

A CPVT é hereditária, descrita por arritmias frequentes intensificadas por stress emocional ou exercício.<sup>10</sup> Esta patologia é diagnosticada nos jovens, maioritariamente *post-mortem*<sup>10</sup>, o que indica que os diagnósticos não são concordantes com a realidade. A maior percentagem dos casos de CPVT deve-se a mutações dominantes no gene do recetor de rianodina do tipo 2 (RYR2).<sup>10</sup> Por outro lado, com menor prevalência, esta patologia pode ser provocada por alterações na calsequestrina 2 (CASQ2), que são recessivas.<sup>10</sup> No geral, as últimas têm como consequência a diminuição da expressão ou atividade de um produto derivado de um gene, o que dá origem a uma doença, se ambos os alelos forem mutantes.<sup>10</sup> Em contrapartida, as mutações dominantes apresentam dois mecanismos: na haploinsuficiência, o gene, expresso pelo segundo alelo, não é suficiente para que a função celular seja contínua;<sup>10</sup> noutros casos, a mutação tem influência negativa sob o alelo WT que sobra, ou, então, há um ganho de função tóxica.<sup>10</sup> Ambas as alterações genéticas têm como consequência a libertação anormal de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, no momento da estimulação adrenérgica, uma vez que ambas as proteínas afetadas constituem um complexo macromolecular, responsável por controlar a libertação de Ca<sup>2+</sup>.<sup>10,11</sup> As mutações referidas anteriormente são abordadas nesta secção, através dos artigos resumidos na Tabela I.

**Tabela I** - Exemplos de estudos de terapia génica desenvolvidos para tratamento da CPVT.

Patologia	Gene mutado	Referências Bibliográficas
Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (CPVT)	Gene da Calsequestrina 2	Denegri <i>et al.</i> (2012) - inserção de um vetor AAV9, com o cDNA do gene murino do CASQ2, com o objetivo de expressar este gene. (Adição de genes)
	Gene do Recetor da Rianodina do tipo 2	Bongianino <i>et al.</i> (2017) - uso dos siRNA's, codificados por um AAV9, para silenciar o alelo mutante. (Silenciamento de genes) Pan <i>et al.</i> (2018) –uso do sistema CRISPR/Cas9, codificado por um AAV9, na edição dos genes mutantes. (Edição de genes)

No caso de mutações recessivas na CASQ2, molécula reduzida dimensão do cDNA deste gene permite o uso dos vírus adeno-associados.<sup>10</sup> Segundo Denegri *et al.*<sup>11</sup>, a hipótese de usar terapia génica, nestes casos, é exequível, uma vez que a indução da calsequestrina 2, em ratos com genes CASQ2 knockout (KO), resultou numa melhoria das anomalias estruturais, moleculares e elétricas, evitando arritmias fatais.<sup>11</sup> No estudo referido acima<sup>11</sup>, os investigadores produziram um vetor AAV-9 que codificava o cDNA do gene murino de CASQ2, e, de seguida, inseriram-no, por injeção intraperitoneal, em murganhos recém-nascidos.<sup>11</sup> Os resultados foram analisados às 20 semanas, tendo sido concluído, pela fluorescência eGFP, que entre 50-60% das células isoladas dos animais infetados expressavam o transgene.<sup>11</sup> Adicionalmente, os estudos demonstraram que a proteína CASQ2, expressa com recurso a vectores virais, se encontra co-localizada com a RyR2, como ocorre nos murganhos WT, um fator importante para a formação do complexo anteriormente referido.<sup>11</sup>

Por outro lado, nas mutações dominantes do gene RyR2, que origina um canal homotetrâmero, o desejável seria a estratégia de substituição de genes, no entanto, o cDNA do gene RyR2 é demasiado grande para ser inserido nos vírus adeno-associados.<sup>10</sup> Num estudo, realizado por Bongianino *et al.*,<sup>12</sup> foram analisados vários siRNA com a perspetiva da sua utilização no silenciamento de um alelo mutante.<sup>12</sup> Destas moléculas, selecionaram uma sequência designada de siRYR2-U10.<sup>12</sup> A siRYR2-U10 foi, de seguida, clonada em miRNAs (miRYR2-U10) e transferido para um plasmídeo de AAV9.<sup>12</sup> Após produção dos AAVs, os investigadores injetaram-nos em murganhos, nos dias 8 e 30, após o nascimento, e às 8 semanas estes animais foram eutanasiados.<sup>12</sup>

Os resultados demonstraram que o siRYR2-U10 reduziu o mRNA R44496C-RYR2 em 80%, sem influenciar os níveis de mRNA selvagem (WT).<sup>12</sup> Além disso, a razão entre o WT e o alelo mutante aumentou para 2:1 nos murganhos tratados com a dose de  $3,9 \times 10^{12}$  de AAV9. Isto foi corroborado pelo gráfico de dose-resposta do AAV9-miRYR2-U10, onde foi possível visualizar um crescimento linear da razão entre o alelo WT e o mutante, à medida que a dose era aumentada.<sup>12</sup> Esta modificação, neste parâmetro, eleva a probabilidade de uma formação funcional do tetrâmero, de 6,25% para 19,75%.<sup>12</sup> Outro dado analisado foi o desenvolvimento de arritmias. Às 8 semanas, foram administradas cafeína e epinefrina para avaliar eventos arrítmicos nos diferentes modelos animais.<sup>12</sup> O uso do miRYR2-U10 preveniu totalmente o aparecimento desses fenómenos.<sup>12</sup>

Como referido anteriormente, na génese das mutações dominantes pode, também, estar um ganho de função.<sup>10</sup> Nestas situações, a estratégia de utilização do sistema CRISPR/Cas9 é uma hipótese para o tratamento desta patologia.<sup>10</sup> Para esse efeito, Pan *et al.*<sup>13</sup> testaram se a

expressão da enzima CRISPR/Cas9 e de uma guia de RNA (gRNA), mediante entrega às células alvo das respectivas sequências, através de um vírus adeno-associado 9, prevenia o aparecimento de arritmias em ratos com CPVT, derivada de mutações no alelo R176Q do gene do RYR2. Os investigadores recorreram à utilização da enzima Cas9 da bactéria *Staphylococcus aureus* (SaCas9) dado que esta é mais pequena que a enzima homóloga produzida pelo *Streptococcus pyogenes*. Desenvolveram também uma guia de RNA (gRNA) cuja função é o reconhecimento do alelo mutante por meio de uma ligação a um local de restrição silencioso.<sup>13</sup> As sequências da gRNA e da SaCas9 foram clonadas nos AAV e iniciou-se a sua produção. O passo seguinte foi a injeção subcutânea dos AAV nos murganhos que apresentavam a mutação em estudo.<sup>13</sup> Para perceber se esta estratégia era exequível, os modelos animais foram submetidos a uma estimulação elétrica às semanas 5 e 6, depois da administração de AAV9 e, para reproduzir a estimulação adrenérgica, os investigadores injetaram o isoproterenol, um agonista  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , e cafeína nos animais.<sup>13</sup>

Depois dos resultados terem sido recolhidos, os investigadores verificaram que nenhum dos murganhos com o alelo mutante, que tinham sido tratados com os AAV9, desenvolveram arritmias.<sup>13</sup> Assim, estes dados comprovaram que a disrupção do alelo R176Q prevenia, significativamente, a ocorrência da taquicardia ventricular.<sup>13</sup> Mas os investigadores decidiram ir mais longe e procurar evidências de que o RYR2 mutante tinha sido removido.<sup>13</sup> Com esta finalidade, desenvolveram *primers* de PCR que tinham como alvo, sequências localizadas na zona do exão 8, que contém a mutação R176Q e que permitiram realizar PCR quantitativa.<sup>13</sup> Concluíram que os murganhos tratados com um vetor gRNA-SaCas9 demonstraram uma redução de 30% do mRNA total de RYR2.<sup>13</sup> Este estudo comprovou que a estratégia de edição de genes pode ser concretizada, no entanto, é necessário aprofundar os conhecimentos sobre a possibilidade de mutagénese, uma vez que foram encontradas algumas inserções nos murganhos com o alelo R176Q mutante.

Por fim, ao analisar os diferentes estudos, há várias possibilidades para o tratamento da CPVT. Apesar disso, existem fatores que dificultam este avanço, tais como o grande número de mutações, que afetam um número reduzido de doentes.<sup>10</sup> Ou seja, seria necessário desenvolver uma estratégia específica para cada alelo, o que, conseqüentemente, implicaria um vetor diferente para cada mutação que teria de ser testado e comercializado separadamente,<sup>10</sup> algo que se torna difícil de implementar.

### 3.1.2 Cardiomiopatia hipertrófica

A cardiomiopatia hipertrófica (HCM) consiste numa hipertrofia, usualmente assimétrica, no ventrículo esquerdo, que afeta os cardiomiócitos provocando a sua desorganização e

crescimento anormal, e, além disso, caracteriza-se por um aumento da fibrose intersticial.<sup>10</sup> Esta patologia manifesta-se através de taquicardia ventricular, fibrilhação ventricular e morte súbita.<sup>10</sup> O seu desenvolvimento deve-se a mutações dominantes nos genes que codificam proteínas do sarcómero, maioritariamente nos genes MYH7 ou MYBPC3, que codificam a cadeia pesada da  $\beta$ -miosina e a proteína-C que liga a miosina, respetivamente.<sup>10</sup> Não se conhecem os mecanismos que causam as arritmias, mas a hipótese mais provável é que estes envolvam alterações na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, que afetam a mobilização deste ião.<sup>10</sup>

A terapêutica disponível, atualmente, tem apenas como função atenuar os sintomas, como a frequência cardíaca elevada e aumentar o relaxamento muscular.<sup>10</sup> Deste modo, não têm como alvo a fisiopatologia da doença ou o controlo da evolução da mesma<sup>10</sup> e, por isso, a terapia génica seria uma mais-valia nesta situação. Na Tabela 2., encontram-se resumidos os artigos que demonstram a viabilidade da mesma.

**Tabela 2** - Exemplos de estudos de terapia génica desenvolvidos para tratamento da HCM.

Patologia	Gene mutado	Referências Bibliográficas
Cardiomiopatia Hipertrófica (HCM)	Gene <i>Mybpc3</i>	Merkulov <i>et al.</i> (2012) – lentivírus que transportam o gene <i>Mybpc3</i> completo para o miocárdio. Estes vetores apresentam muitas desvantagens. <b>(Adição de genes)</b>
		Mearini <i>et al.</i> (2014) – vírus adeno-associados do serotipo 9 (AAV9), conjugados com o promotor troponina T, que transportam o gene <i>Mybpc3</i> completo. <b>(Adição de genes)</b>
		Gedicke-Hornung <i>et al.</i> (2013) – recorrer a oligonucleótidos <i>antisense</i> para tentar aumentar a expressão da Var-4, uma isoforma do mRNA alternativa, com o objetivo de elevar a produção da proteína cMyBP-C. ( <i>exon-skipping</i> )
	Gene <i>MYH7</i>	Jiang <i>et al.</i> (2013) – redução seletiva da expressão da proteína mutante, para resolver a disfunção sarcomérica. Recorreram a um AAV9 que codificava um RNAi (403i), conjugado com o promotor troponina T. O objetivo era a supressão do <i>Myh6</i> , um gene homólogo do <i>MYH7</i> . <b>(Silenciamento de genes)</b>

Uma das estratégias estudadas para potencial tratamento desta patologia é a adição de genes, nas situações em que as mutações no gene MYBPC3 originam haploinsuficiência na cMyBP-C. A investigação, neste contexto, é muito significativa, dado que recém-nascidos com mutações nos dois alelos desenvolvem HCM, que evolui rapidamente para insuficiência cardíaca e morte, ao fim de um ano.<sup>10</sup> Inicialmente, em estudos como Merkulov *et al.*<sup>14</sup> foram usados lentivírus para expressar o gene *Mybpc3* completo no miocárdio dos modelos animais utilizados, o que resultou em melhorias na contração dos cardiomiócitos, *in vitro*, e na função ventricular, *in vivo*. Apesar dos bons resultados, os lentivírus têm várias desvantagens, tais como a

necessidade de injeção direta no miocárdio, a baixa eficácia na transdução e a integração no genoma que pode conduzir a efeitos genotóxicos.<sup>14</sup>

Por estes motivos, Mearini *et al.*<sup>15</sup> recorreram a vírus adeno-associados, do serotipo 9, conjugados com um promotor cardíaco, o promotor da troponina T (AAV9-Mybpc3) para avaliar a exequibilidade da terapia génica em murganhos com *Mybpc3* homozigótico (KI), os modelos animais que mimetizam estas cardiomiopatias, e estudar a possibilidade de esta prevenir o seu desenvolvimento.<sup>15</sup>

Os murganhos transgénicos foram administrados com AAV9-Mybpc3 pela veia temporal, e foram comparados com murganhos WT e com animais administrados com tampão fosfato salino (PBS). O fator de comparação foi a função cardíaca, avaliada por ecocardiografia seriada, que permitiu observar a razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso do corpo (LVM/BW).<sup>15</sup> Os murganhos KI-PBS tinham uma razão LVM/BW duas vezes superior em relação aos animais WT.<sup>15</sup> A administração de AAV9-Mybpc3 preveniu o aumento de LVM/BW, na dose mais elevada de  $3 \times 10^{12}$  vg.<sup>15</sup>, demonstrando, com isto, diferenças significativas com os animais KI-PBS.<sup>15</sup> Além disso, foi observado que, com a administração de AAV9-Mybpc3, havia uma tendência para a prevenção da disfunção cardíaca.<sup>15</sup> Perante isto, às 34 semanas após administração, avaliaram os efeitos a longo prazo da terapia génica em estudo, tendo concluído que o aumento da LVM/BW e a redução da contratilidade miocárdica (FAS) foram prevenidos.<sup>15</sup>

Para analisar o efeito do AAV9-Mybpc3 na função de contração, os investigadores sujeitaram os modelos animais a medições hemodinâmicas, através de cateterismo do ventrículo esquerdo (VE).<sup>15</sup> Relativamente à função sistólica, nos murganhos tratados com AAV9 em doses mais altas, este parâmetro era superior, quando comparado com os KI-PBS.<sup>15</sup> Na função diastólica observou-se o mesmo fenómeno, isto é, o tratamento com AAV9 ajudou a preservar alguma desta função.<sup>15</sup> Os investigadores observaram que a terapia génica em análise aumentou a quantidade de mRNA completo e reduziu os mRNAs mutantes.<sup>15</sup> Além disso, a dose de  $3 \times 10^{12}$  vg de AAV9-Mybpc3 restaurou os níveis de mRNA para o nível dos murganhos WT, assim como normalizou a proteína cMyBP-C completa, tendo permitido que os animais tratados com vírus adeno-associados tivessem atingindo um valor correspondente a 57% do total dos animais WT.<sup>15</sup>

No entanto, na área da terapia génica, deve ser sempre avaliada a possibilidade de a estratégia em estudo atingir outros órgãos, além do alvo desejado. A análise por Western-Blot e RT-PCR permitiu confirmar a deteção de mRNA e proteína cMYBP-C nos ventrículos.<sup>15</sup> mas encontravam-se ausentes ou em baixa quantidade no fígado ou músculo esquelético.<sup>15</sup> Isto

deve-se, provavelmente, à utilização do promotor troponina T que permitiu circunscrever a expressão da proteína ao músculo cardíaco.

Desta maneira, de acordo com os dados retirados deste estudo<sup>15</sup>, a terapia génica é uma possibilidade de tratamento em crianças recém-nascidas com mutações homozigóticas ou heterozigóticas no gene *Mybpc3*, que apresentam um desenvolvimento tardio de HCM.

Neste contexto ainda há estratégias alternativas, mediadas por oligonucleótidos antissense (AON), baseadas em *exon skipping* ou na supressão do alelo mutante responsável pela doença.<sup>10</sup> Em Gedicke-Hornung *et al.*<sup>16</sup>, foi avaliada a possibilidade e a eficácia da transferência dos AON num modelo animal knock in (KI) do gene *Mybpc3*. Estes murganhos sofreram uma transição homozigótica de G>A no exão 6 que deu origem a três mRNAs aberrantes, os quais estão associados a um fenótipo grave da doença e a um mau prognóstico.<sup>16</sup> Contudo, os investigadores identificaram uma variante alternativa, a Var-4, criada com a eliminação dos exões 5 e 6.<sup>16</sup> Com o objetivo de perceber se a Var-4 ocorria naturalmente como uma isoforma de mRNA alternativa realizaram vários ensaios, concluindo que esta variante está presente em murganhos WT em baixa quantidade e que a mesma é funcional e inócua.<sup>16</sup> Isto permitiu a criação da seguinte hipótese: elevar a sua expressão contribuiria para o aumento da proteína cMyBP-C.<sup>16</sup>

Para promover a expressão da Var-4, Gedicke-Hornung *et al.*<sup>16</sup> criaram AONs que se ligam a sequências de DNA, nos exões 5 e 6 do gene *Mybpc3*, responsáveis por direcionar ou aumentar o *splicing*, com o objetivo de induzir a deleção destes exões (*in-frame skipping*). Ora, uma vez que a mutação referida também resulta no *skipping* do exão 6, os investigadores consideraram que só os AON-5 ou os AON 5+6 conseguiriam provocar o *skipping* desses dois exões nos cardiomiócitos dos murganhos KI neo-natais.<sup>16</sup> Os resultados demonstraram que o tratamento com AON-5 só induziu a ablação dos dois exões nos murganhos KI.<sup>16</sup> Por outro lado, com a administração de AON 5+6, o *skipping* dos exões 5 e 6 ocorreu em ambos os modelos animais (WT e KI), o que possibilitou a acumulação da proteína Var-4.<sup>16</sup> Além disso, com este ensaio ficou provado que esta estratégia leva à redução dos mRNAs mutantes nos modelos KI.<sup>16</sup>

A fase seguinte deste estudo consistiu em determinar a eficácia desta estratégia no coração dos murganhos, de modo a obter resultados *in vivo*.<sup>16</sup> Para tal, os investigadores recorreram a AAV serotipo 9 que codificava para a proteína GFP, usando como controlo o tampão de fosfato salino (PBS) e o cloreto de sódio (NaCl), todos eles administrados nos animais KI com 4 semanas de idade.<sup>16</sup> A avaliação dos resultados comprovou que a administração sistémica do U7-AON-5+6 induziu o *skipping* dos exões 5 e 6 e, adicionalmente, aumentou o nível do

mRNA de Var-4.<sup>16</sup> No entanto, uma vez que isto não implica uma maior produção de proteína, os investigadores recorreram a dois anticorpos que permitiram detetar uma quantidade superior da molécula em questão nos murganhos administrados com U7-AON-5+6, relativamente aos grupos de controlo.<sup>16</sup>

A função cardíaca foi o último dado avaliado, através de ecocardiografia, em murganhos KI, que receberam PBS ou AAV9 que codifica U7-AON-5+6.<sup>16</sup> Desta maneira, concluíram que não houve melhoria do fenótipo cardíaco depois da administração dos oligonucleótidos, surgindo, assim, duas hipóteses: a hipertrofia no ventrículo esquerdo e a disfunção cardíaca não podem ser recuperadas em murganhos KI com esta idade; ou a dosagem do vírus era demasiado baixa.<sup>16</sup> Por esse motivo, decidiram aplicar o mesmo princípio aos animais recém-nascidos.<sup>16</sup> Assim, cada modelo animal recebeu  $2 \times 10^{11}$  vg de AAV9, uma quantidade três vezes superior à que foi administrada nos murganhos anteriormente referidos.<sup>16</sup> A avaliação com imunofluorescência demonstrou uma elevada eficiência na transdução. Apesar disso, deve-se dar mais destaque aos animais KI tratados com U7-AON-5+6, que tinham uma razão LVM/BW normal, tal como o FAS, não havendo diferenciação dos animais WT.<sup>16</sup>

Perante este resultado, foi necessário determinar se a maior quantidade de Var-4 estava na origem desta melhoria e, para isso, os investigadores avaliaram as consequências da administração sistémica de AAV9.<sup>16</sup> A análise ecocardiográfica demonstrou uma razão LVM/BW baixa e um FAS elevado nestes animais, em comparação com os murganhos tratados com PBS.<sup>16</sup> Estas situações eram acompanhadas pela inativação completa dos genes fetais, indicando que a Var-4 substitui funcionalmente a cMyBP-C WT.<sup>16</sup> No entanto, para esta terapia ser viável, teria de ser de longa duração.<sup>16</sup> Só que percebeu-se que a quantidade de genoma do vírus foi diminuindo ao longo dos 55 dias do estudo e, por isso, uma das soluções apresentadas baseia-se na necessidade de uma dosagem de vírus superior para conseguirem manter níveis funcionais.<sup>16</sup>

Outro estudo neste âmbito, foi realizado por Jiang *et al.*<sup>17</sup> e aborda a redução seletiva da expressão da proteína mutante como a estratégia mais direta na resolução da disfunção sarcomérica. Assim, como primeiro passo, foi determinado se a supressão do alelo *Myh6* R403Q era possível, um gene utilizado pela sua homologia com o *MYH7*. Para isto, os investigadores usaram RNAi, que demonstrou ser útil na redução de expressão de genes em vários sistemas, transportado por AAV9, que foi conjugado com um promotor de troponina T.<sup>17</sup> Portanto, foram produzidos 17 RNAi, entre os quais detetaram o 403m, que reduziu significativamente a expressão do *Myh6* R403Q.<sup>17</sup> Contudo, a especificidade deste era baixa, dado que silenciou substancialmente a expressão dos genes *wild-type* (WT) e da mutação

*Myh6*.<sup>17</sup> Decidiram, assim, alterar uma base de nucleótido, dando origem à sequência 403i.<sup>17</sup> Com esta mudança, o gene *Myh6* WT deixou de ser afetado, mas o gene mutante reteve a redução de 80% na transcrição do mesmo.<sup>17</sup>

De seguida, incluíram o 403i e shRNA's, respetivamente nomeados de 403i RNAi e *control* RNAi, no vetor AAV9.<sup>17</sup> Para avaliar a eficácia do shRNA 403i *in vivo* foram administradas quantidades variáveis de vírus codificadores de RNAi 403i na cavidade torácica, em animais com 1 dia de idade.<sup>17</sup> Os dados recolhidos demonstraram que a expressão de *Myh6*, após transdução, era comparável em tecidos do VE no grupo de controlo e no 403i, indicando que o alelo WT não foi silenciado *in vivo*.<sup>17</sup> Só houve uma diminuição significativa na expressão relativa de *Myh6* R403Q na quantidade mais elevada de 403i.<sup>17</sup>

Para avaliar o impacto do silenciamento do *Myh6* R403Q no desenvolvimento de HCM,<sup>17</sup> os investigadores injetaram vírus codificadores do RNAi 403i ou RNAi controlo na cavidade torácica de murganhos MHC<sup>403/+</sup>, com 1 dia de idade.<sup>17</sup> Às 5 semanas de idade, os animais receberam ciclosporina A (CsA) ao longo de 3 semanas, para induzir o aparecimento da histopatologia da HCM.<sup>17</sup> A seguir, estes foram avaliados e concluiu-se que o tratamento com CsA, nos animais do grupo de controlo, induziu hipertrofia no ventrículo esquerdo e manifestações celulares graves da HCM.<sup>17</sup> Por outro lado, nos murganhos MHC<sup>403/+</sup>, onde ocorreu a transdução do 403i, não houve desenvolvimento de HCM<sup>17</sup>, além de não haver desorganização do miocárdio e da fibrose se encontrar substancialmente reduzida, relativamente ao controlo.<sup>17</sup>

Para testar a influência da idade em que ocorre a transdução ou a quantidade de vírus no desenvolvimento da doença, os investigadores injetaram dosagens elevadas ( $5 \times 10^{13}$  vg/kg) e baixas ( $5 \times 10^{12}$  vg/kg) de 403i em animais com 3 semanas de idade, cujos resultados indicaram que, com a dosagem mais elevada, não havia alterações indicativas de HCM.<sup>17</sup> Além disso, com a dosagem de  $5 \times 10^{13}$  vg/kg estudaram se o RNAi 403i poderia alterar a patologia pré-estabelecida.<sup>17</sup> Com esta finalidade, os animais sofreram pré-tratamento com CsA o que induziu a hipertrofia e, só depois, é que se procedeu à transdução viral.<sup>17</sup> No entanto, a avaliação ecocardiográfica 2 meses após transdução, demonstrou que não houve alteração no VE e, conseqüentemente, que o tratamento não era eficiente em reverter a doença que já se tinha estabelecido.<sup>17</sup>

Além disso, o efeito do 403i desapareceu ao longo do tempo, algo que foi corroborado com o reaparecimento de hipertrofia no LV no grupo ao qual foi administrado 403i, 11 meses depois.<sup>17</sup> Esta ineficiência deve-se, provavelmente, à redução da expressão do transgene

transportado pelos AAV que ocorre ao fim de 7 meses e, ou alternativamente, aos níveis subterapêuticos de RNAi.<sup>17</sup>

Apesar disto, e do facto do estudo não abordar alguns problemas já conhecidos da terapêutica génica mediada por vírus, como a possibilidade da resposta imune do organismo ou os efeitos *off-target*, Jiang *et al.*<sup>17</sup> lançaram premissas bases da estratégia do silenciamento das mutações responsáveis pela HCM. Assim, pelo facto da mesma ser promissora, esta hipótese deve continuar a ser estudada.

### 3.1.3 Deficiência familiar de lipoproteína lipase (LPLD)

A deficiência em lipoproteína lipase (LPL) é uma doença autossómica recessiva rara e manifesta-se na infância por níveis elevados de triglicerídeos com episódios de dor abdominal, pancreatite aguda recorrente, xantomas eruptivos cutâneos e hepatoesplenomegalia.<sup>18</sup> O diagnóstico desta patologia estabelece-se com a identificação de variantes patogénicas bi-alélicas no LPL, através de testes moleculares genéticos. Esta enzima é central no catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TG), nomeadamente os quilomicrons e as lipoproteínas de baixa densidade.<sup>18</sup> Por esse motivo, quando a LPL é segregada em baixa quantidade, há uma acumulação excessiva de quilomicrons e o risco de pancreatite aumenta. A única solução disponível para o tratamento baseia-se numa dieta restritiva, o que se pode tornar difícil na vida quotidiana dos utentes.<sup>18</sup> Assim, a terapia génica pode ser uma alternativa viável, por induzir a expressão de LPL funcional no músculo. Para esta terapêutica, desenvolveu-se um vetor designado alipogene tiparvec, cuja eficácia e segurança foi aliviada nos ensaios expostos a seguir, sintetizados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Resumo dos artigos utilizados na LPLD.

Patologia	Gene mutado	Referências Bibliográficas
Deficiência Familiar de Lipoproteína Lipase (LPLD)	Gene S447X	Ross <i>et al.</i> (2004) – recorreram ao vírus adeno-associado I para testar a eficácia do aumento da expressão da variante LPL <sup>S447X</sup> , no músculo esquelético. <b>(Adição de genes)</b>
		Rip <i>et al.</i> (2005) – estudos de segurança e biodistribuição da administração de AAVI-LPL <sup>S447X</sup> . Comprovaram que a produção e secreção desta variante era possível com a administração do vetor AAVI-LPL <sup>S447X</sup> em células do músculo esquelético, obtidas por cultura de pacientes selecionados.
		Gaudet <i>et al.</i> (2013) – avaliou a eficácia do alipogene tiparvec, um vetor viral adeno-associado do serotipo I, constituído pela sequência que codifica a variante LPL <sup>S557X</sup> do gene humano. <b>(Adição de genes)</b>

Nos primeiros ensaios, que confirmaram que esta hipótese era viável, realizados em gatos e murganhos demonstrou-se que o transporte de LPL, mediado por vetores adenovirais (Ad), pode melhorar a dislipidemia grave associada a esta doença. No entanto, esta estratégia revelou-se desvantajosa, devido à expressão temporária da LPL relacionada com os vetores escolhidos e à formação de anticorpos contra a LPL humana.

Em 2004, Ross *et al.*<sup>18</sup> desenvolveram um modelo de murganhos para a deficiência em LPL. A variante LPL<sup>S447X</sup> está presente em 18.8 – 25,4% da população geral, e representa uma mutação de ganho de função, que traz consequências benéficas, incluindo a redução dos níveis de TG no plasma e o aumento da quantidade de HDL-C.<sup>18</sup> Adicionalmente, a expressão de LPL<sup>S447X</sup> no músculo resulta numa melhor correção da doença depois da transferência de genes adenovirais em ratos adultos LPL -/-.<sup>18</sup> Estes, de forma semelhante à deficiência humana em LPL, apresentam níveis muito elevados de TG no plasma e quantidades demasiado reduzidas de HDL-C.<sup>18</sup> Por este motivo, os animais LPL -/- foram usados para testar a eficácia da expressão de LPL<sup>S447X</sup> mediada por AAV-I no músculo esquelético.<sup>18</sup>

Antes de administrar AAVI-LPL<sup>S447X</sup> em murganhos, a expressão da LPL funcional foi confirmada em células C2C12 infetadas com este vetor, na presença de adenovírus WT.<sup>18</sup> Após 72h, foi adicionado meio fresco que continha heparina, e, 24 horas depois, detetaram atividade da LPL no lisado de células obtido e no meio utilizado.<sup>18</sup>

Nos ensaios em modelo animal, os murganhos LPL -/- foram tratados com uma dose baixa ( $8 \times 10^{11}$  gc/kg) ou uma dose elevada ( $8 \times 10^{12}$  gc/Kg) de AAVI-LPL<sup>S447X</sup>, administrada por injeção intramuscular em 36 locais.<sup>18</sup> O grupo de controlo, em contrapartida, foi injetado por via intramuscular, em 36 locais, com PBS.<sup>18</sup>

A administração intramuscular (IM) resultou, então, na correção da dislipidemia, dependente da dose, que incluiu uma redução dos níveis de triglicéridos e colesterol total, num valor de 98 e 92%, respetivamente; uma diminuição dos ácidos gordos; e uma recuperação dos níveis de HDL-C, correspondente a 61% dos valores obtidos dos *wild-type*.<sup>18</sup> Esta hiperlipidemia observada no plasma de murganhos LPL -/- foi resolvida uma semana depois da administração da dose alta de AAVI-LPL<sup>S447X</sup>.<sup>18</sup>

Além disso, as análises dos músculos injetados revelaram uma melhoria na sua morfologia e no conteúdo em lípidos, aqui localizados, relativamente aos murganhos que não foram tratados.<sup>18</sup> Os investigadores detetaram facilmente a proteína LPL e sinais da sua atividade nos músculos onde foi injetado o AAVI-LPL<sup>S447X</sup>, que produziu uma atividade 11x superior aos

murganhos WT, mas o mesmo não ocorreu no fígado, coração e tecido adiposo.<sup>18</sup> Isto sugere que a LPL transgénica proveniente do músculo, apesar de ser libertada, manteve-se no local onde houve injeção.<sup>18</sup>

Os animais tratados com a dose elevada demonstraram um aumento significativo na atividade de LPL no plasma, um valor correspondente a 33% dos níveis normais dos murganhos.<sup>18</sup> Por outro lado, a dose 10x inferior resultou num aumento até 9% do valor normal.<sup>18</sup> A análise dos níveis de proteína de LPL humana no plasma, depois do tratamento com a dose alta de AAVI-LPL<sup>S447X</sup>, revelou um aumento 12x superior aos valores obtidos do grupo de controlo.<sup>18</sup>

Para avaliar a duração da expressão de transgenes, um grupo distinto de murganhos LPL-/-, com 3 meses, foi injetado, por via intramuscular, com uma dose de  $8 \times 10^{12}$  gc/kg e seguidos durante um ano.<sup>18</sup> Ao longo deste tempo, detetou-se atividade da proteína LPL, apesar de haver uma redução deste parâmetro, depois das 12 semanas, tanto na expressão residual derivada de adenovírus, como na estratégia atual, mediada por AAVI.<sup>18</sup>

Deve-se referir, ainda, que uma das preocupações relatadas nos primeiros ensaios, estava relacionada com a resposta imune do organismo que, neste caso, não foi detetada.<sup>18</sup> Assim, os resultados demonstram, inequivocamente, que a correção de uma patologia lipídica é possível com a terapia génica.<sup>18</sup>

O passo seguinte na investigação de uma terapêutica para a deficiência em LPL, foi a realização de ensaios *in vivo*, em pacientes. Antes disso, contudo, foi necessário realizar estudos de segurança e biodistribuição em animais, associados com a administração intramuscular de AAVI-LPL<sup>S447X</sup>.<sup>19</sup> Assim, de um ponto de vista técnico, a terapia génica LPL<sup>S447X</sup> para o tratamento desta patologia parece exequível, tendo sido realizados ensaios em murganhos LPL -/- que demonstraram que não é preciso uma atividade elevada da lipoproteína lipase para que exista um impacto significativo nos níveis de TG.<sup>19</sup>

Adicionalmente, a transdução de uma massa muscular demonstrou uma resolução total da lipidémia. Para isto, analisou-se a expressão do LPL humano em plasma pós-heparina e homogeneizados de músculo depois da injeção.<sup>19</sup> No plasma analisado, detetou-se LPL, nos animais que tinham recebido a dose intermédia ou alta, e o mesmo aconteceu nas amostras do músculo.<sup>19</sup>

Os estudos de toxicidade e biodistribuição também revelaram que esta terapia era segura, uma vez que não se observaram mortes ou alterações drásticas na saúde ou alimentação entre os grupos que tinham recebido  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  ou  $1 \times 10^{13}$  de AAVI-LPL<sup>S447X</sup>.<sup>19</sup> E, além disso, o DNA viral foi eliminado do plasma, ao fim de 3-4 dias.<sup>19</sup> As análises hematológicas e dos

parâmetros químicos não revelaram alterações significativas, assim como a avaliação macroscópica não demonstrou efeitos do AAVI-LPL<sup>S447X</sup>.<sup>19</sup> Contudo, a nível microscópico, observou-se uma hiperplasia nos linfóides reversível e menor no baço dos animais masculinos e femininos, injetados com a dose mais alta.<sup>19</sup>

Neste estudo, demonstrou-se, ainda, que o vetor AAVI-LPL<sup>S447X</sup> tinha capacidade para induzir a produção e secreção da LPL ativa nas células do músculo esquelético, algo que foi concluído através da administração do vetor nas células de alguns pacientes obtidas por cultura.<sup>19</sup> Estes pacientes tinham sido previamente diagnosticados com deficiência na LPL, com o objetivo de perceber a elegibilidade para um ensaio clínico,<sup>19</sup> com os seguintes critérios: hipertrigliceridemia grave, atividade baixa de LPL pós-heparina e a confirmação de mutações dos genes.<sup>19</sup> Todos eles seguiam uma dieta com um baixo aporte de gorduras e tinham um historial de pancreatites.<sup>19</sup> Nestes, também se realizou uma análise por sequenciação que revelou mutações *missense* no gene LPL, causadoras de substituições de aminoácidos e perda de atividade da proteína madura.<sup>19</sup> Isto é importante, porque estas células vão ser o alvo de uma futura terapêutica testada clinicamente.

Uma preocupação que se manteve neste estudo foi a possibilidade de uma resposta imune à proteína transgênica ou contra o AAVI. As amostras de plasma e sangue retiradas demonstraram uma concentração elevada de anticorpos contra o AAVI, independentemente da dose viral usada.<sup>19</sup>, que eram inibitórios.<sup>19</sup> Contudo, não foram detetados anticorpos contra o produto transgênico.<sup>19</sup>

Assim, os estudos pré-clínicos demonstraram que a produção de LPL funcional é viável, pelo processo de transferência genética mediada pelo vetor AAVI.<sup>18</sup> Nos humanos, o primeiro ensaio clínico de intervenção decorreu com 8 doentes, no qual foi utilizado AAVI-LPL<sup>S447X</sup> produzido em células embrionárias renais (HEK293).<sup>18</sup> Esta estratégia deu resultados promissores, no entanto, a produção em larga escala desta terapia não era viável e, por isso, tiveram de procurar outras alternativas, nomeadamente a produção do vetor em baculovírus em células de insetos, o que originou o alipogene tiparvovec.<sup>20</sup>

O alipogene tiparvovec é um vetor AAV recombinante do serotipo I, constituído pela sequência que codifica a variante LPL<sup>S447X</sup> do gene humano.<sup>20</sup> A transcrição inicia por um promotor CMV e termina com uma sequência poliadenilada da hormona de crescimento bovina.<sup>20</sup> Para avaliar a eficácia deste vetor, Gaudet *et al.*<sup>20</sup> desenvolveram um estudo aberto, em que na primeira fase, escolheram 22 pacientes com LPLD e com história de pancreatite para um estudo prospetivo observacional de mais de 4 meses, com a finalidade de determinar as manifestações da doença e as consequências de uma dieta com baixo teor de gordura.<sup>20</sup>

Entre os 22 doentes, 14 receberam uma injeção de alipogene tiparvec, mas tiveram indicações para manter a dieta restrita em gorduras.<sup>20</sup>

Os objetivos principais deste estudo eram avaliar a segurança a longo prazo do vetor e conseguir uma redução de TG em jejum de 40%, 3-12 semanas depois da aplicação, em relação aos valores iniciais.<sup>20</sup> Em segundo plano, a finalidade era diminuir os TG para quantidades inferiores a 10 mmol/L em 12 semanas, medir a atividade e a expressão de LPL<sup>S447X</sup> no músculo, em 26 semanas, avaliar a resposta imunitária contra o gene e as cápsides do vetor AAVI e estudar a biodistribuição do vetor de DNA AAVI-LPL<sup>S447X</sup>.<sup>20</sup>

O vetor de DNA derivado do alipogene tiparvec detetou-se transitoriamente no sêrum, saliva, urina, 24 horas depois da administração, e, em níveis muito baixos, no sêmen, valores que sugerem um risco mínimo de transmissão hereditária.

Em relação à segurança, depois da aplicação do alipogene tiparvec, todos os utentes descreveram efeitos adversos leves a moderados, contudo estes não se localizavam num único órgão e os investigadores não identificaram uma relação com a dose administrada.<sup>20</sup> Alguns dos efeitos secundários mais relatados estavam relacionados com o local de injeção, como edema, sensibilidade ou dor que duravam alguns dias/semanas.<sup>20</sup> O efeito secundário mais grave que foi relatado foi febre, desenvolvida por um dos doentes durante 10 horas.<sup>20</sup>

Como foi referido anteriormente, a maior desvantagem da terapia génica com vetores virais adeno-associados é a exposição prévia e diária dos utentes a estes. Consequentemente, quando se injetam estes vetores no organismo dos pacientes selecionados, a presença de anticorpos despoleta uma resposta imunitária do corpo e há uma inibição do efeito terapêutico dos vetores em questão. Neste estudo não se detetaram anti-LPL<sup>S447X</sup>, mas, por outro lado, encontraram-se anticorpos anti-AAVI em, aproximadamente, metade dos doentes antes da administração de alipogene tiparvec, um valor que aumentou depois da injeção do mesmo.<sup>20</sup>

Assim, o alipogen tiparvec, em simultâneo com a dieta baixa em gorduras, foi eficaz em reduzir os níveis de TG plasmáticos, 3 a 12 semanas após administração, em 50% dos pacientes, que atingiram o objetivo de ter uma redução  $\geq 40\%$ .<sup>20</sup> Entre as semanas 19 e 26 houve uma reversão aos valores iniciais, algo que poderia ser indicativo de uma expressão transitória.<sup>20</sup> Contudo, observaram-se vários sinais de benefícios clínicos, independentemente dos níveis de TG, ao longos dos 2 anos seguintes, que comprovaram a eficácia a longo prazo desta terapia génica, tais como: aumento de energia ou melhoria do desconforto abdominal.<sup>20</sup> Adicionalmente, apesar de ser baseado num pequeno número de pacientes, a incidência da pancreatite, no mesmo intervalo de tempo, diminuiu 5 vezes.<sup>20</sup>

A viabilidade desta estratégia, corroborada pelos ensaios referidos anteriormente, tornou o alipogene tiparvovec propício ao investimento e, por isso, os estudos foram mais aprofundados. Este vetor originou um medicamento, produzido pela Amsterdam Molecular Therapeutics BV, designado Glybera.<sup>21</sup> Em 2004, a EMA atribuiu-lhe a designação de medicamento órfão, isto é, um medicamento desenvolvido para o diagnóstico, tratamento ou prevenção de doenças graves que afetam menos de 5 pessoas, em 10 000, na União Europeia.<sup>21</sup> O Glybera era definido assim para o tratamento da deficiência em LPL, uma doença cuja prevalência era de 0,02 em 10 000 pessoas no EEA.<sup>21</sup>

Mais tarde, em 2009, a empresa submeteu uma aplicação para a introdução no mercado e a EMA, depois de considerar todas as evidências e as circunstâncias da doença através dos estudos apresentados, entendeu que os benefícios superavam os riscos em utentes com um longo historial de crises de pancreatite.<sup>21</sup> Desta maneira, o Glybera foi autorizado, sob a definição de autorização de uso especial, uma vez que no momento de submissão de AIM não havia possibilidade de obter informação suficiente sobre o medicamento, devido à raridade da doença.<sup>21</sup> Apesar do seu grande sucesso, em 2017 a AIM foi revogada, dado que o titular tomou a decisão de não a renovar, por falta de viabilidade económica.<sup>21</sup>

### **3.2 Doenças cardiovasculares não monogénicas**

Nos anos de 1990, a terapia génica, depois de uma fase inicial entusiasmante, teve retrocessos, influenciados pela dificuldade na entrega dos ácidos nucleicos no organismo.<sup>22</sup> As primeiras tentativas desenhadas para doenças cardiovasculares tinham como finalidade a indução da angiogénese, através da injeção de grandes quantidades de plasmídeos de DNA que codificavam fatores angiogénicos no miocárdio.<sup>22</sup> No entanto, os estudos realizados demonstraram que esta abordagem não era satisfatória. Adicionalmente, reconhecia-se outra variável responsável pelo insucesso da terapia génica nas doenças cardiovasculares: o modo de administração.<sup>22</sup> A via mais comum nestes casos é a injeção intramiocárdica direta que consiste na realização de uma cirurgia ou na inserção de um cateter percutâneo.<sup>22</sup> Contudo, esta abordagem torna-se desvantajosa por causa das consequências da cirurgia cardíaca.<sup>22</sup>

#### **3.2.1 Indução da Angiogénese**

Como referido acima, o nascimento da terapia génica para as doenças cardiovasculares coincidiu com as várias tentativas de indução da angiogénese em indivíduos com doenças arteriais periféricas ou coronárias. Esta hipótese foi alimentada pelo conhecimento de que a formação de novos vasos sanguíneos é um processo conduzido por citocinas e que a sobre-expressão das mesmas conseguiu, em estudos realizados previamente, resolver condições

agudas de isquemia em modelos animais.<sup>22</sup> Entre 1990 e 2000, realizaram-se vários ensaios que envolveram a injeção intramiocárdica de plasmídeos codificadores de VEGF-A, um dos principais reguladores do processo de angiogênese, com resultados pouco satisfatórios<sup>22</sup>, alguns dos quais estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4** - Resumo dos artigos para a Indução da Angiogênese

Estratégia terapêutica	Fatores angiogênicos	Referências Bibliográficas
Indução da Angiogênese	VEGF <sub>165</sub>	Kastrup <i>et al.</i> (2005) – estudo de fase II, com o objetivo de avaliar a eficácia clínica da transferência de um plasmídeo phVEGF-A <sub>165</sub> , que aumentaria a expressão do VEGF-A <sub>165</sub> . O plasmídeo contém um promotor de citomegalovírus (CMV).
	VEGF <sub>121</sub>	Rosengart <i>et al.</i> (1999) – indução da angiogênese, recorrendo a um adenovírus com cDNA do VEGF <sub>121</sub> . <b>(Adição de genes)</b> Stewart <i>et al.</i> (2006) – estudar a eficácia e segurança de um vetor adenoviral a transportar o transgene codificador do VEGF <sub>121</sub> em doentes com angina grave e sem outras opções de revascularização. <b>(Adição de genes)</b>

Num dos estudos de fase II com aleatorização e dupla ocultação, controlado por um grupo placebo<sup>23</sup>, o objetivo era avaliar a eficácia clínica da transferência de um plasmídeo phVEGF-A<sub>165</sub> por uma via intramiocárdica direta em pacientes com doença coronária grave que não eram elegíveis para revascularização convencional.<sup>23</sup> O plasmídeo em estudo era constituído por um promotor para aumentar a expressão de VEGF-A<sub>165</sub>, enquanto no placebo, o gene foi retirado.<sup>23</sup> Os resultados obtidos não espelhavam diferenças entre os dois grupos e, além disso, foram descritas algumas complicações na altura do procedimento e nos meses seguintes que serviram de acompanhamento do estudo.<sup>23</sup> Aos 3 meses de seguimento, a classificação de angina peitoral melhorou significativamente nos grupos do placebo e do VEGF-A<sub>165</sub>.<sup>23</sup> Contudo, não havia alterações na capacidade de exercício e no consumo de Nitroglicerina nos dois grupos.<sup>23</sup> Desta maneira, não se observaram melhorias na perfusão; em contrapartida, este estudo sugeria uma hipótese de efeitos benéficos anti-isquémicos.<sup>23</sup> Assim como este, há outros estudos, por exemplo o ensaio NORTHERN<sup>24</sup>, que reforçaram a ideia de que esta estratégia não era eficaz, uma vez que não se detetaram melhorias nos objetivos primários dos grupos tratados com VEGF.<sup>24</sup>

Em 2003, abordou-se esta patologia com uma estratégia alternativa que consistia na utilização de adenovírus que codificavam uma cassette de expressão de CMV-Hveg<sub>f165</sub>.<sup>25</sup> Os parâmetros

a ser avaliados eram o diâmetro mínimo do lúmen e a percentagem de estenose ao fim de 6 meses.<sup>25</sup> Observou-se que o VEGF-Adv, administrado a seguir à angioplastia, não influenciou os parâmetros em análise. No entanto, os investigadores detetaram uma melhoria significativa da perfusão miocárdica regional, no grupo ao qual tinha sido administrado o VEGF-Adv.<sup>25</sup> Por outro lado, a frequência dos eventos clínicos foi idêntica em ambos os grupos e não houve sinais de progressão da aterosclerose nos pacientes anteriormente tratados.<sup>25</sup> Desta maneira, confirmou-se que este procedimento não teve um impacto positivo em qualquer resultado clínico ou sintoma.<sup>25</sup>

Os vetores, em particular os vetores virais, permitem transportar o cDNA de forma mais eficaz para terapia génica em doenças cardiovasculares relativamente aos plasmídeos nus. Entre estes, contam-se os adenovírus. Um dos primeiros vetores a serem usados neste contexto expressava cDNA do VEGF-A<sub>121</sub>, cuja expressão era controlada pelo promotor CMV.<sup>26</sup> O vetor, designado Ad<sub>GV</sub>VEGF121.10, foi administrado diretamente numa área isquémica do miocárdio, em indivíduos com doença arterial coronária, divididos em 2 grupos: no grupo A, o vetor foi injetado como um adjuvante de um enxerto de *bypass* de artéria coronária, enquanto no grupo B, os utentes eram apenas sujeitos a terapia génica.<sup>26</sup>

O estudo em análise demonstra que é possível utilizar um vetor adenoviral para a transferência da sequência codificadora do VEGF para o miocárdio de indivíduos com doença coronária arterial grave.<sup>26</sup>

Nos resultados, não havia evidência de inflamação miocárdica ou necrose, nem deterioração da área onde ocorreu a injeção ou angiogénese excessiva, comprovando, assim, a segurança da administração do vetor em estudo no miocárdio.<sup>26</sup>

Além disso, todos os sujeitos demonstraram melhoria na classificação da angina, em ambos os grupos, assim como se detetaram melhorias na contração ventricular.<sup>26</sup> Adicionalmente, a maioria dos indivíduos no grupo B apresentaram dados que evidenciavam uma redução da isquémia reversível, normalmente induzida por *stress*.<sup>26</sup>

Nos parâmetros hematológicos e na urina não se observaram anormalidades sistémicas provocadas pelo vetor.<sup>26</sup> Por último, apesar de a administração no miocárdio ter induzido um aumento de anticorpos anti-Ad na população em análise, não houve sinais de toxicidade.<sup>26</sup>

Há outro estudo<sup>27</sup>, desenhado para comparar a eficácia e a segurança do AdVEGF121, administrado no miocárdio via toracotomia nos pacientes com angina peitoral grave e que não têm opções de revascularização, no qual foram avaliados vários parâmetros. O AdVEGF121 demonstrou uma melhoria significativa no tempo da isquémia induzida pelo exercício na

semana 26, assim como na duração total do exercício à semana 12.<sup>27</sup> Houve, também, melhorias significativas na classe do grupo tratado com este vetor, comparativamente ao controle, à semana 6.<sup>27</sup> Como consequência, os sintomas também melhoraram.<sup>27</sup> Estes dados fornecem algum suporte para a eficácia da terapêutica da angiogênese nos pacientes com sintomas graves de angina que não são elegíveis para procedimentos de revascularização.<sup>27</sup>

Portanto, ao avaliar os estudos acima referidos, percebe-se que a indução da angiogênese é uma estratégia provável, mas que está muito aquém das expectativas dos investigadores. Com isto, evidencia-se a dificuldade de replicar os resultados animais nos seres humanos.

### 3.2.2 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é a incapacidade de bombear sangue para o organismo e manifesta-se por sintomas como tonturas, falta de ar depois de exercício e pernas ou tornozelos inchados.<sup>28</sup> Em 2013, a *Circulation Research* analisou dados sobre a incidência e a prevalência da insuficiência cardíaca, em estudos recolhidos até esse ano. Ao juntar todos os resultados, estes indicaram que a prevalência da IC variava entre 1 e 12%, valores que se baseavam nos EUA e na EU.<sup>29</sup> Os tratamentos disponibilizados atualmente consistem em mudanças no estilo de vida (redução do sódio, tabaco e álcool), medicação (inibidores ECA, inibidores dos recetores da angiotensina, bloqueadores  $\beta$ , diuréticos), dispositivos médicos para controlar o ritmo (pacemakers) ou intervenção cirúrgica. Contudo, nesta patologia também se tentaram arranjar estratégias de terapia génica, resumidas na tabela seguinte (Tabela 5.).

**Tabela 5** - Resumo dos artigos utilizados na Insuficiência Cardíaca.

Patologia	Estratégia Terapêutica	Referências Bibliográficas
Insuficiência Cardíaca (IC)	Aumento da expressão da proteína SERCA2a.	Jaski <i>et al.</i> (2009) – estudos de fase I/2, cujo objetivo é a normalização dos níveis da SERCA2a em doentes com IC, através da transferência do DNA por um AAVI recombinante. <b>(Adição de genes)</b>
	Modulação da reabsorção do $Ca^{2+}$ .	Fish <i>et al.</i> (2013) – o objetivo é avaliar o efeito da expressão de I-Ic a longo prazo, num modelo suíno de IC, recorrendo à transferência genética do transgene ativo pelo AAV9. <b>(Adição de genes)</b>

Um dos alvos principais para intervenções na IC é a modulação do  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos e, nomeadamente, a SERCA2a ATPase, responsável pela recaptação do  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático que é inibido, por sua vez, pelo fosfolambano (PLN) de-fosforilado.<sup>22</sup> O primeiro estudo foi baseado na observação de que a ATPase de  $Ca^{2+}$  sarcoplasmática está

reduzida no coração dos doentes e que a restauração dos seus níveis melhora a função cardíaca em murganhos e suínos.<sup>22</sup>

Jaski *et al.*,<sup>30</sup> referem, no seu estudo, que nos modelos pré-clínicos de IC em ratos, suínos e ovelhas, o aumento dos níveis de SERCA2a recorrendo a vetores AAV, foi bem tolerado e, conseqüentemente, foram detetadas melhorias na função cardíaca e energia.<sup>30</sup> Baseado nisto, realizou-se um ensaio constituído pela fase 1 e fase 2 de investigação, com o objetivo de normalizar os níveis desta proteína em pacientes com IC, através da transferência do DNA da SERCA2a, por um AAV recombinante.<sup>30</sup>

Neste primeiro estudo realizado em pessoas, o AAV1/SERCA2a demonstrou um perfil de segurança aceitável, apesar da morbilidade e mortalidade elevada desta doença, não tendo revelado mudanças significativas em órgãos *major*, nem alterações na pressão arterial, frequência cardíaca ou temperatura corporal.<sup>30</sup> Embora a estratégia seja promissora, há certas características que têm de ser consideradas durante a investigação, como o facto da reposição dos níveis da SERCA2a não ser imediata, sendo que o pico destes níveis ocorre ao fim de 1 mês.<sup>30</sup>

Além disso, em todas as terapêuticas virais, a presença de anticorpos contra as proteínas da cápside dos AAV, pode impedir a entrada e disponibilização dos agentes virais e, como consequência, inibir o efeito terapêutico pretendido.<sup>30</sup> Por este motivo, na seleção dos doentes, procedeu-se à avaliação da presença de anticorpos e, caso fossem detetados anticorpos anti-AAV, os indivíduos eram excluídos do estudo.<sup>30</sup>

É importante destacar que o ensaio em análise é pequeno, mas demonstrou melhorias em vários parâmetros, tais como: sintomáticos, funcionais, biomarcadores e função do ventrículo esquerdo (VE) e volume do VE no final da sístole.<sup>30</sup>

Apesar disto, os autores deste estudo<sup>30</sup> consideram que ainda há necessidade de realizar mais ensaios para avaliar clinicamente esta estratégia.

Para esta patologia, há uma segunda proposta de terapêutica, cujo alvo é a modulação da reabsorção do  $Ca^{2+}$ , através da sobreexpressão de uma forma de I-Ic, responsável por ligar a PPI.<sup>22</sup> Com esta intervenção, os investigadores querem elevar os níveis de SERCA2a e restaurar a estimulação  $\beta$  – adrenérgica.<sup>22</sup> Como é habitual, antes dos ensaios clínicos, é importante proceder à realização de estudos em animais, com a finalidade de entender a viabilidade e a segurança da estratégia em análise. Um dos estudos realizados neste contexto, é o Fish *et al.*<sup>31</sup>, desenhado com o objetivo de avaliar os efeitos de expressão de I-Ic a longo prazo, num modelo suíno de insuficiência cardíaca. Com este estudo<sup>31</sup>, avaliaram-se as

alterações dinâmicas nos volumes ventriculares e contratilidade, depois de uma transferência genética do transgene ativo de I-Ic pelo AAV9 que entrega o gene seletivamente ao coração, via intracoronária.

Inicialmente foram selecionados 21 porcos que sofreram enfarte do miocárdio, dos quais sobreviveram 14.<sup>31</sup> Ao dividir este grupo, 8 animais receberam AAV9.I-Ic e nos restantes injetaram uma solução salina.<sup>31</sup> O efeito na função cardíaca foi avaliado no momento inicial, na altura da transferência (1 mês) e 3 meses depois.<sup>31</sup>

O débito cardíaco aumentou em todos os grupos 1 mês depois do enfarte do miocárdio, mas no segundo mês o grupo que recebeu a solução salina, teve uma deterioração do mesmo, sugerindo, assim, que houve progressão da insuficiência cardíaca.<sup>31</sup> Em contrapartida, nos animais que foram injetados com AAV9.I-Ic o débito cardíaco foi preservado.<sup>31</sup> Da mesma maneira, a fração de ejeção manteve-se no grupo do vetor, enquanto no grupo de controlo este parâmetro foi piorando de 44% para 37,4% ao longo de 3 meses.<sup>31</sup> Além destes, os animais, aos quais se administraram a solução salina, demonstraram uma diminuição da função sistólica e, em contrapartida, a injeção de AAV9.I-Ic nos suínos preservou a mesma.<sup>31</sup> No processo da diástole, os animais, nos quais foram administrados o AAV9, manifestaram uma melhoria após 1 mês, sem relevância, ao ser comparada com os modelos animais que receberam a solução salina.<sup>31</sup> Para avaliar a eficácia, os autores analisaram a expressão de I-Ic e concluíram que esta proteína estava presente no tecido do ventrículo esquerdo nos animais que receberam AAV9.I-Ic.<sup>31</sup> Os investigadores ainda avaliaram a biodistribuição e estes obtiveram resultados que demonstraram variabilidade dos níveis de expressão de I-Ic.<sup>31</sup> Apesar desta, há transfeção do I-Ic no grupo de tratamento, na zona do miocárdio e no tecido de cicatriz.<sup>31</sup>

Resumidamente, os dados apresentados indicam que a terapia génica pode levar a melhorias funcionais nos porcos que sofreram enfarte do miocárdio.<sup>31</sup> Ou seja, há vários parâmetros que sugerem proteção contra a progressão da insuficiência cardíaca, como os dados referidos anteriormente e a fração de ejeção.<sup>31</sup> Além disso, não sugerem efeitos negativos da sobre-expressão de I-Ic nestes modelos pré-clínicos.<sup>31</sup> Estes resultados positivos impulsionaram, então, a criação de um estudo que irá explorar a segurança, viabilidade e eficácia de uma única administração intracoronária de BNPI16.sc-CMV.IIc, designado de NAN-101.<sup>32</sup> O estudo referido é de fase I e prevê-se que terminará em 2024.<sup>32</sup>

### 3.2.3 Fibrilhação auricular

A fibrilhação auricular (FA) é a arritmia crónica mais prevalente, atingindo 10% da população com mais de 70 anos.<sup>33</sup> Em Portugal, suspeita-se que existam 200,000 a 250,000 pessoas diagnosticadas com fibrilhação auricular.<sup>33</sup> Esta patologia caracteriza-se por batimentos cardíacos irregulares, devido à incapacidade do coração de bombear o sangue que pode ter como consequência a formação de coágulos no próprio coração.<sup>33</sup> Por este motivo, a fibrilhação auricular é a principal causa de Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC) e, desta maneira, os especialistas aconselham o uso de terapêuticas anticoagulantes para, assim, fluidificar o sangue e evitar estes eventos.<sup>33</sup> Os tratamentos atualmente disponibilizados têm como objetivo restaurar o ritmo sinusal ou a taxa de resposta ventricular recorrendo a agentes farmacológicos ou terapias de ablação com cateter.<sup>34</sup> Por isso, a terapia génica foi estudada no artigo descrito na tabela abaixo. (Tabela 6.).

**Tabela 6** - Resumo do artigo para Fibrilhação auricular.

Patologia	Estratégia Terapêutica	Referências Bibliográficas
Fibrilhação Auricular (FA)	Manipulação da condução elétrica do coração.	Donahue et al. (2000) – administraram em corações suínos um adenovírus recombinante que expressa a $\beta$ -galactosidade da <i>E.coli</i> (Ad $\beta$ gal) e um adenovírus codificante da subunidade $G\alpha_{12}$ (AdG <sub>i</sub> ). O objetivo era, com o segundo vetor, aumentar a produção da $G\alpha_{12}$ que iria mimetizar os efeitos dos antagonistas $\beta$ , criando um bloqueio. ( <b>Adição de Genes</b> )

A maioria dos casos de AF estão associados com uma taxa ventricular elevada.<sup>34</sup> Por este motivo, como o nódulo auriculoventricular (AV) é o único caminho entre as aurículas e os ventrículos, as estratégias terapêuticas direcionam-se ao diminuir a velocidade da transmissão no nódulo AV, com o objetivo de reduzir a taxa ventricular.<sup>34</sup>

Com este propósito, um dos primeiros estudos publicados teve como premissa a manipulação da condução elétrica do coração, num modelo animal.<sup>35</sup> Neste estudo, 5 animais receberam Ad $\beta$ gal, um adenovírus recombinante que expressa  $\beta$ -galactosidase da *E.coli*, e nos outros 5 administraram AdG<sub>i</sub>, adenovírus que codifica para a subunidade  $G\alpha_{12}$ , porque os investigadores pensaram na possibilidade de o excesso da  $G\alpha_{12}$  mimetizar os efeitos dos antagonistas  $\beta$  – adrenérgicos.<sup>35</sup>

Para avaliar os resultados, os autores basearam-se em outras investigações que sugeriam que a expressão de adenovírus era detetável 3 dias depois da administração, e decidiram analisar a expressão destes genes e as alterações no fenótipo 7 dias após a injeção.<sup>35</sup> O maior desafio

deste ensaio era a biodisponibilização do vetor no miocárdio, uma vez que queriam recorrer a técnicas minimamente invasivas.<sup>35</sup> Assim, através da manipulação do tecido e da dinâmica vascular, os genes que codificam a  $\beta$ -gal e o  $G\alpha_{12}$  foram transferidos para 45% dos miócitos do nódulo AV, por cateterização intracoronária<sup>35</sup>.

Além disso, os investigadores tiveram em atenção estudos que mostravam que os adenovírus de primeira geração eram responsáveis por inflamação severa e perda de expressão dos transgenes.<sup>35</sup> E, por isso, ao analisar isto, o mesmo foi observado em Donahue *et al.*<sup>35</sup> Isto é, os investigadores detetaram uma resposta inflamatória limitante, depois da administração do vetor, mas esta inflamação não teve efeito no nódulo AV.

Desta maneira, comprovaram que a sobre-expressão de um composto inibitório da cascata de sinalização  $\beta$ -adrenérgica anula a condução do nódulo AV<sup>35</sup> e que, conseqüentemente, a transferência genética *in vivo* consegue alterar o processo de condução elétrica descrito nas arritmias comuns.<sup>35</sup>

#### **4. Distrofia Muscular de Duchenne**

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária progressiva que afeta os músculos maioritariamente diagnosticada em homens.<sup>36</sup> Os sintomas que se destacam são o enfraquecimento progressivo e a perda de músculo esquelético e cardíaco, que prende os indivíduos afetados a uma cadeira de rodas aos 12 anos e que os mata quando estes chegam à sua terceira década, devido a complicações cardíacas e respiratórias.<sup>37</sup> É por este motivo que se refere a patologia em questão nesta monografia. Na génese da distrofia muscular de Duchenne encontram-se mutações no gene DMD que codifica a distrofina, uma proteína que preserva a integridade das fibras musculares e que as protege dos danos provocados pela contração.<sup>37</sup> A transmissão desta doença procede-se com um padrão recessivo no cromossoma X e pode ocorrer, mesmo que não estejam relatados casos de DMD na família.<sup>36</sup> Nesta secção, encontram-se algumas estratégias terapêuticas que foram estudadas para esta patologia e que se encontram resumidas na Tabela 7.

**Tabela 7** - Resumo dos artigos utilizados em DMD

Patologia	Terapia Génica	Referências Bibliográficas
Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	Vírus Adeno-Associados	Elangkovan & Dickson (2021) – transferência do gene responsável pela distrofina, através de um vetor AAV. Esta estratégia, em modelos animais, demonstrou melhorias fisiopatológicas substanciais. Isto ajudou à realização de estudos em humanos, no entanto estes ainda não terminaram. <b>(Adição de genes)</b>
	Terapia Antissense	Elangkovan & Dickson (2021) – restauração da sequência de leitura para produzir distrofina parcialmente funcional. Contudo, esta hipótese está reservada a uma população limitada.
	Edição de Genes	Olson (2021) – utilizaram modelos roedores de DMD com uma mutação <i>nonsense</i> da distrofina no exão 23. Testaram se a Cas9 e um <i>template</i> de DNA poderiam corrigi-la e normalizar a expressão da proteína. <b>(Edição de genes)</b>

#### 4.1 AAV na DMD

Até ao momento, não há registos de terapêuticas eficientes para a deterioração da função muscular nos pacientes com DMD. Há, sim, uma abordagem promissora que consiste na transferência do gene responsável pela distrofina, através de um vetor AAV.<sup>37</sup> Contudo, apesar deste processo ter demonstrado resultados positivos nos animais, a transposição para uma terapêutica em humanos é difícil.<sup>37</sup>

Um dos maiores desafios em desenhar terapias génicas para a DMD é o tamanho do cDNA que codifica o gene da DMD. Isto é um problema, dado que os AAV só conseguem transportar genomas e transgenes de tamanhos limitados (até 4.5 Kb).<sup>37</sup> No entanto, a disponibilidade da sequência completa da distrofina e o conhecimento dos domínios proteicos possibilitaram a eliminação de algumas sequências codificantes no gene, enquanto a função da proteína era preservada.<sup>37</sup> Desta maneira, produziram-se genes recombinantes responsáveis por codificar variantes de mini-distrofinas com potencial clínico.<sup>37</sup> Com este objetivo, os estudos com modelos animais de DMD demonstraram melhorias fisiopatológicas substanciais, a seguir à administração sistémica de microdistrofinas através de vetores adeno-associados, o que potenciou a realização de ensaios clínicos, em doentes.<sup>37</sup>

Apesar dos estudos clínicos ainda não terem terminado, surgiram alguns dados interessantes que corroboram a hipótese de que a transferência genética de AAV para o músculo é viável de uma perspetiva clínica e industrial, mesmo que ainda se detetem vários problemas, como a otimização da dosagem, o controlo da resposta imune ou a entrega dos genes na terapia génica para DMD.<sup>37</sup>

Ora, tendo em conta que a transferência do gene de microdistrofina por AAV apresentou eficácia nos modelos pré-clínicos e alguma segurança em estudos clínicos iniciais, o principal objetivo das investigações é a transposição da terapia em questão para os medicamentos de uso humano, tendo em atenção a dosagem necessária, a repetição do tratamento, a modulação imunitária e o fabrico a nível industrial.<sup>37</sup> Ora, um dos vários problemas que ainda tem que ser resolvido na terapia génica com AAVs é a potência e a eficácia.<sup>37</sup>, apesar da origem sistémica da DMD implicar, devido à necessidade de restauração da proteína no sistema muscular, uma dose elevada de AAV.<sup>37</sup> Como já foi referido anteriormente, o AAV é um vetor seguro, mas origina respostas imunitárias a doses tão elevadas que têm como consequência a redução da eficácia do tratamento. Uma das hipóteses para a resolução disto, seria uma cassette de expressão potente o que, em teoria, permitiria a administração de uma dosagem menor para atingir o efeito terapêutico.<sup>37</sup> O tropismo do AAV também é importante e deve ser avaliado.<sup>37</sup> No caso da DMD, o serotipo ideal deveria ter um alto tropismo muscular, uma vez que é necessária uma dosagem e uma transdução elevada para o tratamento da DMD.<sup>37</sup>

## 4.2 Terapia Antissense em DMD

Elangkovan & Dickson<sup>37</sup> reviram outra estratégia, relacionada com tecnologia antissense. Nos doentes com DMD, a sequência de leitura pode ser restaurada com o objetivo de produzir distrofina parcialmente funcional, contudo esta hipótese está reservada a uma população limitada de pacientes com DMD.<sup>37</sup> No ano de publicação deste artigo<sup>37</sup>, em 2021, estavam aprovadas pela FDA 4 terapias antissense, que usaram um morfolino (PMO) específico, para o tratamento da DMD, apesar destas terem resultados com eficácia moderada.

## 4.3 Edição de genes em DMD

O nascimento do CRISPR/Cas9 trouxe a possibilidade de corrigir mutações responsáveis pela DMD e, desta maneira, reduzir as consequências patológicas da doença.<sup>38</sup> Há muitos aspetos da DMD que tornam a edição de genes com a CRISPR uma hipótese de terapêutica. Por exemplo, a estrutura da proteína de distrofina possibilita a eliminação dos segmentos internos que podem ter mutações de perda de função e, deste modo, restaurar a sequência de leitura de RNA.<sup>38</sup> A localização do gene em questão no cromossoma X permite a potencial correção do alelo mutante nos rapazes diagnosticados com esta doença, sem haver efeitos secundários como a mutagénesis.<sup>38</sup>

Nos estudos iniciais, os investigadores utilizaram modelos roedores de DMD que albergam uma mutação *nonsense* da distrofina no exão 23 e testaram se a Cas9 e um *template* de DNA poderiam corrigi-la e normalizar a expressão desta proteína.<sup>38</sup> Nestes estudos, os animais

descendentes continham entre 2 a 100% de correção do gene da distrofina e concluíram, também, que é apenas necessário 15% de edição de genes para obter uma expressão desta proteína a níveis dos animais WT, no músculo esquelético e coração.<sup>38</sup>

Apesar disto, há diversas barreiras à correção da DMD através da edição de genes, nomeadamente a impossibilidade de desenvolver e otimizar uma estratégia que seja específica para cada mutação existente na DMD e a entrega eficiente, *in vivo*, dos constituintes responsáveis por este procedimento a toda a musculatura esquelética e cardíaca.<sup>38</sup>

## 5. Conclusão

Ao longo desta monografia, foram descritos alguns dos estudos envolvendo a terapia génica nas doenças cardiovasculares ou em doenças hereditárias que têm uma componente cardíaca. Em todos eles, há uma premissa em comum: a terapia génica é uma estratégia muito promissora para o tratamento ou cura de DCV. No entanto, em simultâneo com os resultados positivos, detetam-se muitos desafios à eficácia e segurança da mesma.

Como foi referido anteriormente, esta terapêutica divide-se em várias modalidades, com mecanismos de atuação diferentes. Devido a isto, a terapia génica é aplicada a diversos grupos de doenças, contudo, nas DCV, a investigação é diminuta.<sup>39</sup> Isto é surpreendente, uma vez que as doenças cardiovasculares são a causa maioritária de mortes súbitas a nível mundial e, por isso, os especialistas recorrem a moléculas pequenas que preservam a função residual dos órgãos afetados, mas que não oferecem uma resolução definitiva.<sup>39</sup>

Portanto, tal como mencionado acima, nos últimos anos têm-se realizado vários ensaios que pretendem transformar a capacidade atual de cura dos pacientes diagnosticados com estas patologias.<sup>39</sup> No entanto, apesar de se obterem dados favoráveis em modelos animais de DCV, a transposição destes para a etapa clínica frequentemente falha. Por exemplo, no caso dos vetores AAV, estes produziram resultados clínicos robustos nas doenças não cardiovasculares.<sup>10</sup> Mas nas patologias em questão, os desafios incluem a demonstração da eficácia de transdução e da segurança das doses administradas. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos que ultrapassem os anticorpos neutralizantes pré-existentes, permitiriam a administração de uma dose múltipla e, assim, iriam potenciar a utilidade clínica dos vetores virais.<sup>10</sup> Além disso, a redução dos elevados custos da produção clínica de AAVs seria essencial para motivar as empresas a investir nestes ensaios e nestas patologias.<sup>10</sup> Por outro lado, nos oligonucleótidos e nos mRNAs modificados, o desenvolvimento de processos que ajudem à entrega eficiente e seletiva aos cardiomiócitos seria importante.<sup>10</sup>

Concluindo, a investigação em estratégias de terapia génica para tratamento de doenças cardiovasculares constitui um alvo lógico e com enorme potencial curativo visto que são as patologias com maior prevalência a nível mundial, há uma necessidade médica não atendida e em muitos casos existe conhecimento sobre as bases moleculares de doença suficiente para a conceção de estratégias de terapia génica potencialmente eficazes. A terapia génica é promissora neste contexto, mas requer um investimento na investigação de forma a alcançar-se a desejável eficácia e segurança.

## 6. Bibliografia

1. OMS – **Cardiovascular diseases**. [Acedido a 4 de março de 2023]. Disponível na Internet: [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)
2. SNS – **Doenças Cardiovasculares**. (2017) [Acedido a 4 de março de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2017/10/04/doencas-cardiovasculares/>
3. EMA – **Advanced therapy medicinal products**. [Acedido a 4 de março de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>
4. Malech, H. L., Garabedian, E. K., & Hsieh, M. M. (2022) - **Evolution of Gene Therapy, Historical Perspective**. Hematology/Oncology Clinics of North America. 36 (2022) 627–645. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2022.05.001>
5. Zhang H, Zhan Q, Huang B, Wang Y and Wang X (2022) - **AAV-mediated gene therapy: Advancing cardiovascular disease treatment**. Front. Cardiovasc. Med. 9:952755. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.952755/full>
6. Bejar, N., Tat, T. T., & Kiss, D. L. - **RNA Therapeutics: the Next Generation of Drugs for Cardiovascular Diseases**. Current Atherosclerosis Reports. 24 (2022) 307–321. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11883-022-01007-9>
7. Vermersch, E., Jouve, C., & Hulot, J. S. - **CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells**. Cardiovascular Research. 116 (2020) 894–907. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz250>
8. Zhang, B. - **CRISPR/Cas gene therapy**. Journal of Cellular Physiology. 236 (2021) 2459–2481. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.30064>
9. NHS INFORM – **Inherited Heart Conditions**. [Acedido a 5 de maio]. Disponível na Internet: <https://www.nhsinform.scot/illnesses-and-conditions/heart-and-blood-vessels/conditions/inherited-heart-conditions>
10. Bezzerides, V. J., Prondzynski, M., Carrier, L., & Pu, W. T. - **Gene therapy for inherited arrhythmias**. Cardiovascular Research. 116 (2020) 1635–1650. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa107>
11. Denegri M, Avelino-Cruz JE, Boncompagni S, De Simone SA, Auricchio A, Villani L, Volpe P, Protasi F, Napolitano C, Priori SG - **Viral gene transfer rescues arrhythmogenic phenotype and ultrastructural abnormalities in adult calsequestrin-null mice with**

**inherited arrhythmias.** *Circulation Research*. 110 (2012) 663-668. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.263939>

**12.** Bongianino, R., Denegri, M., Mazzanti, A., Lodola, F., Vollero, A., Boncompagni, S., Fasciano, S., Rizzo, G., Mangione, D., Barbaro, S., Di Fonso, A., Napolitano, C., Auricchio, A., Protasi, F., & Priori, S. G. - **Allele-specific silencing of mutant mRNA rescues ultrastructural and arrhythmic phenotype in mice carriers of the R4496C mutation in the ryanodine receptor gene (RYR2).** *Circulation Research*. 121 (2017) 525–536. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310882>

**13.** Pan, X., Philippen, L., Lahiri, S. K., Lee, C., Park, S. H., Word, T. A., Li, N., Jarrett, K. E., Gupta, R., Reynolds, J. O., Lin, J., Bao, G., Lagor, W. R., & Wehrens, X. H. T. - **In Vivo Ryr2 editing corrects catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.** *Circulation Research*. 123 (2018) 953–963. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313369>

**14.** Merkulov, S., Chen, X., Chandler, M. P., & Stelzer, J. E. - **In vivo cardiac myosin binding protein C gene transfer rescues myofilament contractile dysfunction in cardiac myosin binding protein C null mice.** *Circulation: Heart Failure*. 5 (2012) 635–644. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.968941>

**15.** Mearini, G., Stimpel, D., Geertz, B., Weinberger, F., Krämer, E., Schlossarek, S., Mouro-Filiatre, J., Stoehr, A., Dutsch, A., Wijnker, P. J. M., Braren, I., Katus, H. A., Müller, O. J., Voit, T., Eschenhagen, T., & Carrier, L. - **Mybpc3 gene therapy for neonatal cardiomyopathy enables long-term disease prevention in mice.** *Nature Communications*. Vol. 5, n° 5515 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms6515>

**16.** Gedicke-Hornung, C., Behrens-Gawlik, V., Reischmann, S., Geertz, B., Stimpel, D., Weinberger, F., Schlossarek, S., Précigout, G., Braren, I., Eschenhagen, T., Mearini, G., Lorain, S., Voit, T., Dreyfus, P. A., Garcia, L., & Carrier, L. - **Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in Mybpc3-targeted knock-in mice.** *EMBO Molecular Medicine*. Vol. 5, (2013), p. 1060–1077. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202168>

**17.** Jiang, J., Wakimoto, H., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. - **Allele-Specific Silencing of Mutant Myh6 Transcripts in Mice Suppresses Hypertrophic Cardiomyopathy.** *Science*. Vol. 342, n° 6154 (2013), p. 111-114. <https://doi.org/10.1126/science.1236921>

**18.** Ross, C. J. D., Twisk, J., Meulenberg, J. M., Liu, G., Van Den Oever, K., Moraal, E., Hermens, W. T., Rip, J., Kastelein, J. J. P., Kuivenhoven, J. A., & Hayden, M. R. - **Long-Term Correction of Murine Lipoprotein Lipase Deficiency with AAV1-Mediated Gene Transfer of**

**the Naturally Occurring LPL S447X Beneficial Mutation.** Human Gene Therapy. Vol. 15, n° 9 (2004), p. 906-919. <http://doi.org/10.1089/hum.2004.15.906>

19. Rip, J., Nierman, M. C., Sierts, J. A., Petersen, W., Van Den Oever, K., Raalte, D. Van, Ross, C. J. D., Hayden, M. R., Bakker, A. C., Dijkhuizen, P., Hermens, W. T., Twisk, J., Stroes, E., Kastelein, J. J. P., Kuivenhoven, J. A., & Meulenberg. - **Gene Therapy for Lipoprotein Lipase Deficiency: Working Toward Clinical Application\***. Human Gene Therapy. Vol. 16, n° 11 (2005), p. 1276-1286. <http://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1276>

20. Gaudet, D., Méthot, J., Déry, S., Brisson, D., Essiembre, C., Tremblay, G., Tremblay, K., De Wal, J., Twisk, J., Van Den Bulk, N., Sier-Ferreira, V., & Van Deventer, S. - **Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAVI-LPL S447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: An open-label trial.** Gene Therapy. Vol. 20, (2013), 361–369. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.43>

21. EMA – **Glybera**. [Acedido a 12 de junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

22. Cannatà, A., Ali, H., Sinagra, G., & Giacca, M. - **Gene Therapy for the Heart Lessons Learned and Future Perspectives.** Circulation Research. Vol. 126, n° 10 (2020), p. 1394–1414. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315855>

23. Kastrup, J., Jørgensen, E., Rück, A., Tägil, K., Glogar, D., Ruzylo, W., Bøtker, H. E., Dudek, D., Drvota, V., Hesse, B., Thuesen, L., Blomberg, P., Gyöngyösi, M., & Sylvén, C. - **Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A 165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris: A randomized double-blind placebo-controlled study: The Euroinject One trial.** Journal of the American College of Cardiology, Vol. 45, n° 7, p. 982–988. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.12.068>

24. Stewart, D. J., Kutryk, M. J. B., Fitchett, D., Freeman, M., Camack, N., Su, Y., Siega, A. Della, Bilodeau, L., Burton, J. R., Proulx, G., & Radhakrishnan, S. - **VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: Results of the NORTHERN trial.** Molecular Therapy. Vol. 17, n° 6 (2009), p.1109–1115. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.70>

25. Hedman, M., Hartikainen, J., Syväne, M., Stjernvall, J., Hedman, A., Kivelä, A., Vanninen, E., Mussalo, H., Kauppila, E., Simula, S., Närvänen, O., Rantala, A., Peuhkurinen, K., Nieminen, M. S., Laakso, M., & Ylä-Herttuala, S. - **Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic**

- myocardial ischemia: Phase II results of the Kuopio angiogenesis trial (KAT).** *Circulation*. Vol. 107, n° 21 (2003), p. 2677–2683. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000070540.80780.92>
26. Rosengart, T. K., Leonard, Lee. Y., Patel, S. R., Sanborn, T. A., Parikh, M., Bergman, G. W., Hachamovitch, R., Szulc, M., Kligfield, P. D., Okin, P. M., Hahn, R. T., Devereux, R. B., Post, M. R., Hackett, N. R., Foster, T., Grasso, T. M., Lesser, M. L., Isom, ; O Wayne, & Crystal, R. G. - **Angiogenesis Gene Therapy Phase I Assessment of Direct Intramyocardial Administration of an Adenovirus Vector Expressing VEGF121 cDNA to Individuals With Clinically Significant Severe Coronary Artery Disease.** *Circulation*. Vol. 100, n° 5 (1999), p. 468-474. <https://doi.org/10.1161/01.cir.100.5.468>
27. Stewart, D. J., Hilton, J. D., Arnold, J. M. O., Gregoire, J., Rivard, A., Archer, S. L., Charbonneau, F., Cohen, E., Curtis, M., Buller, C. E., Mendelsohn, F. O., Dib, N., Page, P., Ducas, J., Plante, S., Sullivan, J., Macko, J., Rasmussen, C., Kessler, P. D., & Rasmussen, H. S. - **Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: A phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF121 (AdVEGF121) versus maximum medical treatment.** *Gene Therapy*. Vol. 13, n° 21 (2006), p. 1503–1511. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302802>
28. NHS – **Overview. Heart failure.** (2022) [Acedido a 22 de junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.nhs.uk/conditions/heart-failure/>
29. Roger, L. V. – **Epidemiology of Heart Failure.** *Circulation Research*. Vol. 128, n° 10 (2021), p. 1421-1434. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318172>
30. Jaski, B. E., Jessup, M. L., Mancini, D. M., Cappola, T. P., Pauly, D. F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K. M., & Hajjar, R. J. - **Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase I/2 Clinical Trial.** *Journal of Cardiac Failure*. Vol. 15, n° 3 (2009), p. 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.013>
31. Fish, K. M., Ladage, D., Kawase, Y., Karakikes, I., Jeong, D., Ly, H., Ishikawa, K., Hadri, L., Tilemann, L., Muller-Ehmsen, J., Samulski, R. J., Kranias, E. G., & Hajjar, R. J. - **AAV9.I-Ic delivered via direct coronary infusion in a porcine model of heart failure improves contractility and mitigates adverse remodeling.** *Circulation: Heart Failure*. Vol. 6, n° 2 (2013), p. 310–317. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.971325>

- 32. NIH – ClinicalTrials.gov. NAN-101 in Patients With Class III Heart Failure (NAN-CS101).** (2023) [Acedido a 22 de junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04179643>
- 33. CUF – Fibrilhação auricular.** [Acedido a 23 de junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.cuf.pt/saude-a-z/fibrilhacao-auricular>
- 34. Ravindran, D., Kok, C., Farraha, M., Selvakumar, D., Clayton, Z. E., Kumar, S., Chong, J., & Kizana, E. - Gene and Cell Therapy for Cardiac Arrhythmias.** *Clinical Therapeutics*. Vol. 42, n° 10 (2020), p. 1911–1922. Excerpta Medica Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.09.001>
- 35. Donahue, J. K., Heldman, A. W., Fraser, H., Mcdonald, A. D., Miller, J. M., Rade, J. J., Eschenhagen, T., & Marbán, E. - Focal modification of electrical conduction in the heart by viral gene transfer.** *Nature Medicine*. Vol. 6, (2000), p. 1395-1398. [https://doi.org/10.1038\\_82214](https://doi.org/10.1038_82214)
- 36. NIH – Duchenne muscular dystrophy.** (2023) [Acedido a 24 de junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/6291/duchenne-muscular-dystrophy>
- 37. Elangkovan, N., & Dickson, G. - Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy.** *Journal of neuromuscular diseases*. Vol. 8, n° s2 (2021), p. S303–S316. <https://doi.org/10.3233/JND-210678>
- 38. Olson, E. N. - Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 118, n° 22 (2021). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2004840117>
- 39. Ciucci, G., Colliva, A., Vuerich, R., Pompilio, G., & Zacchigna, S. - Biologics and cardiac disease: challenges and opportunities.** *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 43, n° 11 (2022), p. 894–905. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.06.001>