

Diogo Fernando Gonçalves de Oliveira

Terapia Génica da Insuficiência Cardíaca: Potencial Clínico da Sobreexpressão da SERCA2a

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Índice

Índice.....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. Insuficiência Cardíaca.....	1
1.1 Classificação Funcional da New York Heart Association.....	3
1.2 Estádios na Evolução da IC	4
1.3 Fração de Ejeção	5
1.4 Fisiopatologia.....	6
1.5 Etiologia	9
1.6 Epidemiologia	11
1.7 Sintomas e Sinais	16
1.8 Diagnóstico	17
1.9 Prognóstico.....	18
1.10 Tratamento Farmacológico da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida.....	19
1.11 Tratamento Farmacológico da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada	20
2. Terapia Génica.....	21
2.1 Definição de Terapia Génica.....	23
2.2 Extensão da transferência de ácidos nucleicos para o coração	23
2.3 Estratégias de entrega de ácidos nucleicos	24
2.4 Investigação Pré-Clínica	24
2.5 Investigação Clínica	25
2.6 Vetores.....	27
Vetores Não Virais.....	27
Vetores Virais	28
Vetores Adenovirais.....	29
Vetores de Vírus Adeno-associados.....	31
Vetores Retrovirais	33
Vetores Lentivirais.....	36
3. Alvos para Terapia Génica na Insuficiência Cardíaca – SERCA2a.....	39

3.1 Insuficiência Cardíaca e Homeostasia do Cálcio	41
3.2 Isoformas da SERCA	42
3.3 Estrutura da SERCA.....	43
3.4 Regulação da Atividade da SERCA	43
3.5 SERCA na Insuficiência Cardíaca.....	44
4. Análise dos Ensaios Clínicos.....	47
4.1 Ensaio Clínico 1 – “Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase I/2 Clinical Trial”	50
4.2 Ensaio Clínico 2 – “Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) - A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase in Patients With Advanced Heart Failure”	64
4.3. Ensaio Clínico 3 – “A Phase 2b, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multinational, Multicenter, Randomized Study Evaluating the Safety and Efficacy of Intracoronary Administration of MYDICAR® (AAVI/SERCA2a) in Subjects With Heart Failure”	77
5. Conclusão.....	79
Referências Bibliográficas	83

Agradecimentos

Esta tese é fruto da colaboração de várias pessoas a quem não posso deixar de prestar o meu sincero agradecimento.

Ao orientador da tese, Professor Doutor Luís Almeida pelos conhecimentos científicos, acompanhamento, auxílio e disponibilidade que em muito contribuíram para a minha formação académica e para o desenvolvimento de todas as etapas deste projeto.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira por todo o apoio, dedicação e conselhos que foram essenciais à estruturação da tese.

A todos os colaboradores da Unidade de Investigação Clínica em Cardiologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E. pelo companheirismo e esperança que depositaram em mim.

A todos os docentes e colegas do Mestrado de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por toda a aprendizagem, amizade e partilha durante os dois últimos anos.

Aos meus amigos e familiares que estiveram sempre do meu lado e me ajudaram a concluir uma etapa muito importante da minha vida.

Um agradecimento muito especial à minha mãe...por tudo!

Resumo

Sendo responsáveis por cerca de 40% dos óbitos, as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte em Portugal, constituindo também uma importante causa de incapacidade. Entre estas patologias, a insuficiência cardíaca assume um papel de destaque no que diz respeito à mortalidade e morbilidade das doenças cardiovasculares devido às crescentes taxas de incidência e prevalência. Apesar dos medicamentos das diferentes classes farmacológicas indicados para o tratamento da insuficiência cardíaca terem vindo a contribuir para a melhoria da condição clínica dos doentes, face ao grande número de hospitalizações e mortes, impõe-se a adoção de estratégias terapêuticas mais eficazes.

O aprofundamento do conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares bem como dos alvos responsáveis pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca possibilitaram a abordagem desta condição recorrendo à terapia génica. A identificação duma relação direta entre a proteína *Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA2a) e os níveis de Ca²⁺ que estão envolvidos no processo de contração e relaxamento do coração conduziram a estudos pré-clínicos e clínicos envolvendo a sobreexpressão desta proteína. Assim, o principal objetivo desta dissertação é apresentar o estado da arte da terapia génica na insuficiência cardíaca com enfoque nos estudos envolvendo a proteína SERCA2. Numa altura em que cada vez mais se destaca a importância da Medicina Baseada na Evidência é mandatório analisar os ensaios clínicos realizados de modo a obter o maior nível de evidência científica. Esta monografia contemplou a análise de três ensaios clínicos de sobreexpressão da SERCA2a envolvendo terapia génica.

A análise dos dados de investigação clínica sugere que há forte probabilidade da insuficiência cardíaca vir a ser a primeira condição cardiovascular a ter disponível na prática clínica um tratamento envolvendo terapia génica. Deste modo, prevê-se uma alteração no paradigma do tratamento da insuficiência cardíaca e uma consequente melhoria da qualidade de vida e condição clínica dos doentes.

Abstract

Responsible for about 40% of deaths in Portugal, cardiovascular diseases are the leading cause of death in Portugal and they are also a major cause of disability. Among these diseases heart failure assumes a prominent role with regard to mortality and morbidity of cardiovascular diseases due to increasing rates of incidence and prevalence. Despite the improvements of the patient's clinical condition mediated by different drugs indicated for the treatment of heart failure, the large number of hospitalizations and deaths demand the investigation and translation of more effective therapeutic strategies.

Recent progresses in the knowledge of molecular and cellular mechanisms of heart failure, as well as the targets responsible for the development of this condition suggest that gene therapy may become an effective strategy to treat this condition. In particular, the direct relationship identified between *Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA2a) and Ca²⁺ levels involved in the contraction and relaxation of the heart made this protein a promising target for overexpression by a gene therapy approach. Therefore the main objective of this dissertation is to present the state of the state of the art of gene therapy in heart failure, with a focus on the clinical studies involving SERCA2. The increasing importance of evidence-based medicine, make it mandatory to analyze the available clinical trials in order to obtain the highest level of scientific evidence. This monograph included the analysis of three clinical trials about overexpression of SERCA2a with gene therapy.

The analysis of clinical research data available suggest that heart failure may become the first condition among cardiovascular diseases to have an available clinical treatment involving gene therapy. This is expected to induce a strong paradigm shift in the treatment of heart failure and a consequent improvement in the quality of life and patients' condition.

Índice de Figuras

Figura 1 - Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca.(Adaptado de PINTO, Ana Mota, 2007).....	9
Figura 2 - Prevalência estimada baseada na idade de todos os tipos de IC na população acima dos 25 anos com um Intervalo de Confiança de 95%.	13
Figura 3 - Taxa de prevalência estimada em doentes com IC-FEP com um Intervalo de Confiança de 95%. Círculos preenchidos: homens; círculos vazios: mulheres.....	14
Figura 4 - Taxa de prevalência estimada em doentes com IC-FER com um Intervalo de Confiança de 95%.	15
Figura 5 - Fluxograma para o diagnóstico da Insuficiência Cardíaca. (Adaptado de MCMURRAY, John, et al.; 2012)	18
Figura 6 - Organização estrutural de um adenovírus	29
Figura 7 - Fases da terapia génica com vetor adenoviral	30
Figura 8 - Organização genómica do AAV.....	32
Figura 9 - Processo de produção dos vetores rAAV.. ..	33
Figura 10 - Organização do genoma de um retrovírus.	34
Figura 11 - Processo de integração do retrovírus.....	34
Figura 12 - Processo de produção vetores retrovirais	35
Figura 13 - Organização genómica dos lentivírus.....	37
Figura 14 - Sinalização do cálcio durante o processo de relaxamento-contração.....	42
Figura 15 - Atividade da SERCA2a como alvo terapêutico	44
Figura 16 - Representação esquemática do estudo	53
Figura 17 - Alteração absoluta da FEVE ao longo do tempo	58
Figura 18 - Alterações da classe NYHA ao longo do tempo.....	59
Figura 19 - Alterações nas distâncias percorridas no teste de marcha de 6 minutos ao longo do tempo	60
Figura 20 - Percentagem de alteração do NT-proBNP ao longo do tempo	60
Figura 21 - Fluxograma do recrutamento dos doentes do estudo.....	66
Figura 22 - Alterações da FEVE	71
Figura 23 - Alterações no teste de marcha de 6 min	72
Figura 24 - Alterações no NT-proBNP	72
Figura 25 - Eventos cardiovasculares ao longo de 12 meses	73

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação New York Heart Association	3
Tabela 2 - Estádios da Insuficiência Cardíaca	5
Tabela 3 - Mecanismo Neurohumorais da Insuficiência Cardíaca (Adaptado de KATZ, A. M. 2000).....	7
Tabela 4 - Sintomas mais típicos e sinais mais específicos da Insuficiência Cardíaca	16
Tabela 5 - Sintomas menos típicos e sinais menos específicos da Insuficiência Cardíaca.	16
Tabela 6 - Sumário dos estudos pré-clínicos com proteínas que regulam o cálcio através da terapia génica (Adaptado de ZOUEIN, F. e BOOZ, G, 2013).....	25
Tabela 7 - Ensaio Clínicos com SERCA2a na Insuficiência Cardíaca (Adaptado de ZOUEIN, F. e BOOZ, G., 2013).....	26
Tabela 8 - Principais vírus utilizados como vectores em terapia génica	28
Tabela 9 - Expressão das principais proteínas na Insuficiência Cardíaca	45
Tabela 10 - Esquema terapêutico para os diferentes grupos do estudo.....	53
Tabela 11 - Características de <i>baseline</i> dos doentes	55
Tabela 12 - Definição das alterações significativas nos <i>endpoints</i> do estudo.....	57
Tabela 13 - Avaliação da qualidade metodológica do estudo CUPID fase 1/2.....	62
Tabela 14 - Características de <i>baseline</i> dos doentes.	67
Tabela 15 - Taxas de incidência de SAEs e AEs nos grupos do estudo	70
Tabela 16 - Sumário das pontuações da análise individual de eficácia aos 6 meses	70
Tabela 17 - Avaliação da qualidade metodológica do estudo CUPID fase 2.	76

Lista de Abreviaturas

AAV – Vírus adeno-associado;

Ac – Anticorpo;

ADN – Ácido desoxirribonucleico;

AE – Evento Adverso;

AIM – Autorização de Introdução no Mercado;

ARN – Ácido ribonucleico;

ATP – Adenosina Trifosfato;

BB – Bloqueador Beta;

BNP – Peptídeo Natriurético tipo B;

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio;

EC – Ensaio Clínico;

ECG – Eletrocardiograma;

EMA – Agência Europeia do Medicamento;

FE – Fração de Ejeção;

FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo;

HTA – Hipertensão arterial;

IC – Insuficiência Cardíaca;

IC-FEP – Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção preservada;

IC-FER – Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção reduzida;

IECA – Inibidor da Enzima de Conversão da Angiotensina;

ITR – *Inverted Terminal Repeats*;

IV – Intravenoso;

MLWHFQ – Questionário *Minnesota Living With Heart Failure*;

NT-proBNP – Fração N-terminal pro-peptídeo natriurético cerebral;

NYHA – *New York Heart Association*;

PLN – Fosfolamban;

RAA – Renina-Angiotensina-Aldosterona;

rAAV – Vírus adeno-associado recombinante;

RAM – Reação Adversa Medicamentosa;

RS – Reticulo Sarcoplasmático;

SAE – Evento Adverso Grave;

SERCA – *Sarcoplasmatic Reticulum Ca²⁺-ATPase*;

VE – Ventrículo Esquerdo.

I. Insuficiência Cardíaca

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome em que o coração deixa de conseguir bombear sangue suficiente para o resto do corpo devido a anomalias estruturais e/ou funcionais do coração, podendo dividir-se em IC aguda e IC crónica. A primeira diz respeito a um acontecimento de insuficiência inicial e súbito ou a uma descompensação de IC crónica. A IC crónica caracteriza-se por sintomas de IC (dispneia, fadiga e edema dos membros inferiores) tanto durante o exercício como em repouso e evidência de disfunção cardíaca sistólica ou diastólica em repouso (1).

A IC pode ainda ser dividida em IC direita e IC esquerda, dependendo se o congestionamento sanguíneo resultante afetar predominantemente a circulação pulmonar ou sistémica ou IC sistólica e diastólica consoante a função do coração atingida (1).

I.1 Classificação Funcional da *New York Heart Association*

A classificação funcional da *New York Heart Association* (NYHA) (Tabela 1) tem sido usada para selecionar doentes na maioria dos ensaios clínicos (EC) em IC de forma a identificar quais os doentes que vão beneficiar de uma determinada terapêutica.

Os doentes em classe NYHA I não têm sintomas devido à IC. Os doentes em classe NYHA II, III ou IV são, por vezes, descritos como tendo sintomas ligeiros, moderados ou severos, respetivamente.

Tabela 1 - Classificação *New York Heart Association* (2)

Classe I	Sem limitações na atividade física; As atividades físicas diárias não causam falta de ar, cansaço ou palpitações.
Classe II	Ligeiras limitações na atividade física; Conforto em períodos de descanso, mas as atividades físicas diárias causam falta de ar, cansaço ou palpitações.
Classe III	Limitações marcadas na atividade física; Conforto em períodos de descanso, mas qualquer atividade física causa falta de ar, cansaço ou palpitações.
Classe IV	Incapacidade de realizar qualquer atividade física sem desconforto; Apresentação de sintomas em períodos de descanso; Qualquer atividade física aumenta o desconforto.

Principais limitações da classificação NYHA: (3)

- Grande grau de subjetividade, quer da parte do doente quer da parte do médico;
- A classe funcional de um doente com IC pode mudar por pequenos períodos de tempo, especialmente em situações de descompensação e, por este motivo, não é aconselhável o uso desta classificação nestas situações;
- A classe funcional NYHA tem uma fraca correlação com o nível de disfunção ventricular e com o prognóstico da doença.

I.2 Estádios na Evolução da IC

Dadas as limitações da avaliação funcional da NYHA e para uma melhor compreensão do processo de desenvolvimento da IC, vários especialistas europeus e americanos defendem uma classificação que englobe os estádios pré-clínicos da IC de modo a permitir intervenções preventivas efetivas. As *guidelines* clínicas da *American Heart Association / American College of Cardiology* de 2012 propõem uma classificação por estadio, apresentada na Tabela 2, que descreve a sequência dos eventos da IC (3).

Através da análise da Tabela 2 podemos verificar que o estadio A identifica doentes em risco de desenvolver IC, mas sem evidência de anomalias estruturais cardíacas. O estadio B inclui doentes com anomalias estruturais cardíacas, normalmente devido à progressiva remodelação do VE, mas que ainda não apresenta evidência de IC. O estadio C indica a presença de anomalias estruturais com evidência prévia ou atual de IC. Por fim, o estadio D refere-se a doentes com tipos de IC graves e resistentes ao tratamento padrão, requerendo medidas como a infusão contínua de agentes inotrópicos, dispositivos de assistência ventricular, transplantes cardíacos, entre outros. Apesar da existência da classificação NYHA, este tipo de abordagem reflete a progressão expectável dos doentes no decurso da doença e é útil para tomar decisões terapêuticas em cada fase, tendo como objectivo atrasar ou parar o desenvolvimento da IC (3).

No entanto, o objectivo deste novo sistema de estratificação não é substituir mas sim complementar a classificação NYHA, sendo aconselhável o uso de ambos os métodos na avaliação médica de um doente com suspeita de IC (3).

Tabela 2 - Estádios da Insuficiência Cardíaca (4)

Estadio	Descrição	Exemplos
A	<ul style="list-style-type: none"> Doentes com alto risco de desenvolver IC devido à presença de condições que estão fortemente associadas ao desenvolvimento da IC; Ausência de anomalias estruturais ou funcionais do pericárdio, miocárdio ou válvulas cardíacas; Ausência de sinais ou sintomas de IC. 	<ul style="list-style-type: none"> Hipertensão sistémica; Doença arterial coronária; <i>Diabetes mellitus</i>; História de cardiotoxicidade ou alcoolismo; História familiar de febre reumática; História familiar de cardiomiopatia.
	<ul style="list-style-type: none"> Doentes que desenvolveram doença cardíaca estrutural fortemente associada ao desenvolvimento de IC; Ausência de sinais ou sintomas de IC. 	<ul style="list-style-type: none"> Hipertrofia ventricular esquerda ou fibrose; Dilatação ventricular esquerda ou hipocontratilidade; Doença valvular assintomática; Enfarte agudo do miocárdio (EAM) prévio.
C	<ul style="list-style-type: none"> Doentes com sintomas atuais ou prévios de IC e com doença cardíaca estrutural. 	<ul style="list-style-type: none"> Dispneia ou cansaço por disfunção sistólica ventricular esquerda;
D	<ul style="list-style-type: none"> Doentes com doença cardíaca estrutural avançada; Sintomas marcados de IC em repouso independentemente da terapêutica máxima aplicável e que requerem intervenções especializadas. 	<ul style="list-style-type: none"> Doentes hospitalizados por IC; Doentes em lista de espera para transplante cardíaco; Doentes em ambulatório que recebem tratamentos intravenosos (IV) para a IC; Doentes em cuidados paliativos devido a IC.

1.3 Fração de Ejeção

A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) é o principal parâmetro para o prognóstico da IC. Matematicamente, a fração de ejeção (FE) é o volume sistólico (volume diastólico final – volume sistólico final) dividido pelo volume diastólico final. Na prática, a FE

é a percentagem de sangue que o ventrículo esquerdo ejeta para a artéria aorta durante a sístole.

Para além da sua importância no prognóstico da IC, a FE é extremamente importante na seleção de doentes em EC. Na maioria dos casos, a medição deste parâmetro é feita por ecocardiografia ou angiografia de radionuclídeos. Os principais ensaios clínicos em doentes com IC e com FE reduzida normalmente recrutam doentes com FEVE $\leq 35\%$.

Recentemente, os EC têm recrutado doentes com IC e uma FEVE de 40 – 45% sem outra anomalia cardíaca causal (valvular ou doença do pericárdio). Alguns destes doentes não têm uma FE completamente normal ($> 50\%$) mas também não têm uma redução da função sistólica. Por este motivo, o termo IC com FE preservada (IC-FEP) foi criado para descrever este tipo de doentes. Estes normalmente não têm um coração dilatado e muitos têm um aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo (VE) e um aumento da aurícula esquerda. Para além disso, a maioria apresenta evidência de disfunção diastólica, que é a principal causa de IC nestes doentes (daí o termo “IC diastólica”) (1).

Neste contexto, é importante salientar que os valores da FE e os respectivos intervalos de normalidade dependem da técnica de medição usada, do método de análise e até do operador.

I.4 Fisiopatologia

A IC caracteriza-se por uma redução do débito cardíaco e aumento da pressão venosa, acompanhadas de alterações moleculares que, por sua vez, conduzem a uma deterioração progressiva do coração e morte prematura dos cardiomiócitos (5).

A fisiopatologia da IC é complexa e deve ser compreendida a vários níveis. Tradicionalmente, os estudos focavam-se nas alterações hemodinâmicas do coração como se tratasse de um órgão isolado. Atualmente, é necessário compreender as alterações a nível molecular e celular bem como as alterações neuro-humorais entre o coração e os outros órgãos (6).

O organismo dispõe de mecanismos compensatórios para atenuar o deficiente bombeamento de sangue, que no seu conjunto definem uma resposta neuro-humoral. Esta compreende três elementos fundamentais: (7)

- 1) Reação hemodinâmica de defesa (visa manter a pressão de perfusão de órgãos vitais e o débito cardíaco, através da retenção hidrossalina, vasoconstrição arteriolar e aumento da estimulação cardíaca), mediada por cascatas de sinalização, controladas por mensageiros extracelulares que não atuam apenas no coração;
- 2) Resposta inflamatória (o coração e outros órgãos parecem atuar como se estivessem a reagir a agentes estranhos; destaca-se o papel das citocinas pró-inflamatórias, quer na circulação sistêmica, quer localmente no miocárdio; do stress oxidativo e dos radicais livres de oxigênio);
- 3) Resposta hipertrófica com remodelagem ventricular, a qual inclui alterações da biologia e estrutura dos cardiomiócitos e na geometria da câmara ventricular.

Como se pode observar na Tabela 3, os mecanismos neuro-humorais classificam-se em “reguladores” (com propriedades vasoconstritoras, antinatriuréticas, inotrópicas e proliferativas) e “contrarreguladores” (efeitos diametralmente opostos). Afiguram-se como prejudiciais a longo-prazo, contribuindo para a instalação e cronicidade da IC.

Tabela 3 - Mecanismo Neurohumorais da Insuficiência Cardíaca (Adaptado de KATZ, A. M. 2000 (5))

Componentes “Reguladores”	Componentes “Contrareguladores”
Catecolaminas – efeito periférico	Catecolaminas – efeitos centrais
Angiotensina II	Peptídeos natriuréticos
Aldosterona	Óxido nítrico
Arginina Vasopressina	Bradicinina
Endotelina	Dopamina
Tromboxano	Prostaglandinas vasodilatadoras
	Adrenomedulina

A função ventricular depende da interação dos seguintes fatores: (8)

- Contratilidade cardíaca;
- Pré-carga (pressão de sangue presente no ventrículo do coração após o seu enchimento passivo e contração auricular);
- Pós-carga (resistência que a artéria aorta oferece à saída de sangue a partir do ventrículo esquerdo);
- Frequência cardíaca.

Os três primeiros fatores regulam o volume de ejeção e o quarto fator regula o volume/minuto. A diminuição da função sistólica do ventrículo esquerdo caracteriza-se por uma FEVE < 50%. Em resposta, o organismo ativa vários mecanismos de compensação na tentativa de manter uma perfusão tecidual adequada. Estes mecanismos incluem a estimulação do sistema nervoso simpático, a ativação do sistema RAA (Renina-Angiotensina-Aldosterona) e a vasorregulação local. Embora benéficos numa fase inicial, estes mecanismos de compensação podem ter um efeito prejudicial que se traduz por uma remodelação do VE associada ao aumento excessivo do consumo de oxigênio pelo miocárdio, o que conduz a uma deterioração secundária da função cardíaca (8).

As consequências da IC (Figura 1) surgem quer anterogradamente, por diminuição do débito cardíaco, quer retrogradamente, por acumulação do retorno venoso no coração (dilatação cardíaca), nos pulmões (edema pulmonar) ou nos tecidos periféricos (edema periférico). Apesar de ambas as situações ocorrerem simultaneamente, uma delas pode dominar o quadro clínico. Por outro lado, as alterações clínicas associadas à IC dependem: (8)

- Do lado afetado (esquerdo ou direito);
- Da magnitude da redução do débito cardíaco;
- De se tratar de uma falência aguda ou crónica.

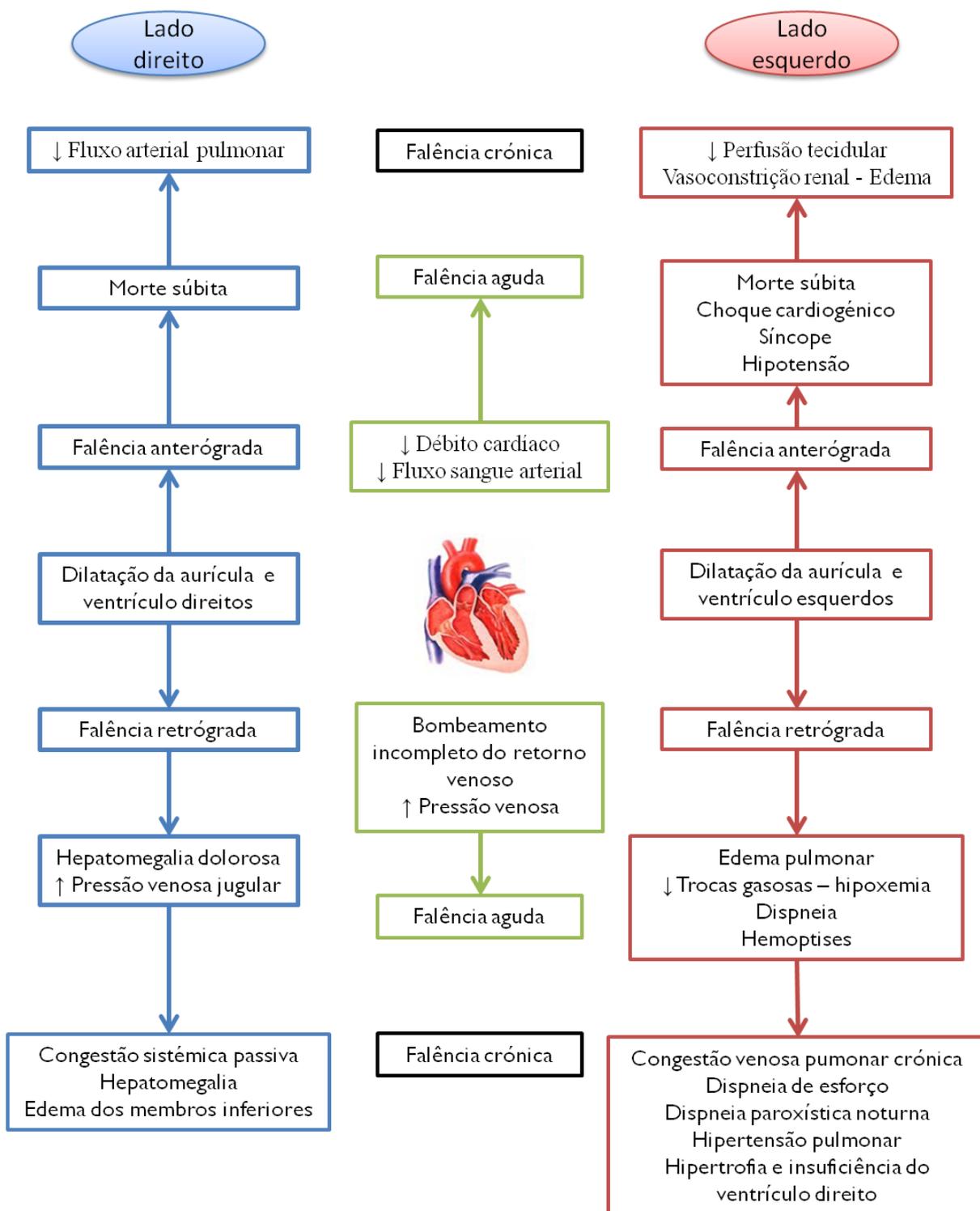


Figura I - Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca. (Adaptado de PINTO, Ana Mota, 2007 (8))

1.5 Etiologia

Qualquer condição que conduza a uma alteração na estrutura ou função do VE pode predispor um doente a desenvolver IC. Nos países desenvolvidos, a doença coronária é a

principal causa de IC em ambos os sexos, correspondendo a 60-75% dos casos desta patologia (9).

As doenças que podem levar ao desenvolvimento da IC são muito diferentes e a sua identificação é de extrema importância, uma vez que podem modificar o diagnóstico, terapêutica e abordagem preventiva, bem como determinar o prognóstico. O tipo de anomalia estrutural cardíaca e os fatores de risco que a causam devem constar no processo clínico do doente bem como os fatores que desencadeiam uma descompensação aguda (3).

Podemos dividir as causas da IC em três tipos: fatores de risco, determinantes e precipitantes. Cada uma destas causas aumenta a necessidade de trabalho cardíaco ou impede que este reaja de forma bem sucedida em resposta às exigências do nosso organismo (3).

Fatores de risco

Os fatores de risco, ou seja, que predisõem o indivíduo à IC, mas não conduzem necessariamente à doença, podem ser classificados como: (3)

- **Etiológicos** – dos quais fazem parte alterações estruturais congênitas ou adquiridas dos vasos periféricos, circulação coronária, pericárdio, miocárdio, endocárdio ou válvulas cardíacas;
- **Provavelmente etiológicos** – exercem um efeito indireto na deterioração da função ventricular esquerda. O principal é a hipertensão arterial (HTA) pois o risco de se desenvolver IC em indivíduos com hipertensão arterial é o dobro do existente na população sem esse fator. A *diabetes mellitus* e a febre reumática podem igualmente contribuir para o aparecimento de IC, pela sua correlação com o desenvolvimento de patologia cardíaca, respectivamente coronária e valvular;
- **Não etiológicos** – fatores de risco apenas indicativos, tais como, idade avançada, sexo masculino, obesidade, cardiomegália, capacidade vital reduzida, fumadores, proteinúria e alterações no eletrocardiograma (ECG) (bloqueio do ramo esquerdo e repolarização ventricular anormal).

Determinantes da doença

Os determinantes da doença englobam condições que alteram os mecanismos que regulam a função ventricular, carga hemodinâmica e a frequência cardíaca. Podemos dividi-las em: (3)

- Alterações do miocárdio primárias (cardiomiopatia dilatada idiopática, hipertrófica ou restritiva);
- Alterações do miocárdio secundárias (isquemia, aneurisma ventricular, disfunção da válvula mitral, de origem infecciosa, inflamatória, tóxica e metabólica);
- Sobrecarga hemodinâmica devida a um aumento de pressão (hipertensão arterial, estenose aórtica, hipertensão pulmonar), ou devida a um aumento de volume (hipervolemia, insuficiência aórtica, mitral, ou tricúspide, comunicações entre as cavidades cardíacas);
- Anomalias no enchimento ventricular (hipertrofia ventricular, massas intracardíacas, obstrução cardíaca, constrição pericárdica);
- Alterações no ritmo cardíaco (bradi e taquiarritmias, perda da sincronia aurículo-ventricular).

Precipitantes da doença

Existem ainda fatores que precipitam a IC quando surgem em doentes que já são portadores de uma alteração cardíaca estrutural. Esses fatores precipitantes podem ser: (3)

- De origem cardíaca, nomeadamente arritmias, cardiomiopatia isquêmica, fármacos inotrópicos negativos, uso de antagonistas do cálcio, bloqueadores beta ou antiarrítmicos;
- De origem extracardíaca, por infecção, embolismo pulmonar, anemia, toma de anti-inflamatórios não esteróides, cirurgia ou substâncias tóxicas.

1.6 Epidemiologia

A informação epidemiológica relativa à incidência, prevalência e prognóstico da IC na população é escassa. Atualmente, este tipo de informação é baseada em registos hospitalares, pequenos questionários, ensaios clínicos, estatísticas nacionais e certificados de

óbito. Uma melhor fonte de informação, embora limitada, é baseada em estudos coorte de forma a monitorizar o desenvolvimento da IC ao longo do tempo (10).

A IC é um problema crescente em todo o mundo, com mais de 20 milhões de pessoas afetadas. Aproximadamente 1-2% da população adulta nos países desenvolvidos tem IC. A prevalência desta condição segue um padrão exponencial, aumentando com a idade, com uma prevalência de cerca de 10% em indivíduos com mais de 70 anos de idade (10).

Embora a incidência da IC seja mais baixa nas mulheres do que nos homens, as mulheres constituem pelo menos metade dos casos de IC devido à sua esperança média de vida ser superior à dos homens. A prevalência total está a aumentar, em parte devido às atuais terapias que permitem aumentar a sobrevivência dos doentes através do tratamento de doenças cardíacas, tais como EAM, doença valvular cardíaca e arritmias.

A IC-FEP tem um perfil epidemiológico e etiológico diferente da IC com fração de ejeção reduzida (IC-FER). Os doentes com IC-FEP são mais velhos, maioritariamente mulheres e com maior peso do que os doentes com IC-FER (10).

Antes de 1990, 60-70% dos doentes faleciam nos 5 anos após o diagnóstico e as admissões hospitalares por agravamento dos sintomas eram frequentes e recorrentes, levando a um grande número de hospitalizações por IC em muitos países. Os avanços ao nível do tratamento farmacológico e não farmacológico levaram a uma redução entre 30-50% no número de hospitalizações nos últimos anos e a um decréscimo da taxa de mortalidade (10).

O estudo EPICA (Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca e Aprendizagem – *Epidemiology of Heart Failure and Learning*) teve como objetivo primário estimar a prevalência da IC em função do sexo e idade da população residente em Portugal continental em 1998, de acordo com as *Guidelines* da Sociedade Europeia de Cardiologia para o diagnóstico da IC. Trata-se de um estudo observacional *cross-sectional* baseado nos doentes que recorrem aos cuidados de saúde primários. De modo a garantir uma abrangência universal da amostra, os centros foram selecionados de forma aleatória em cada distrito em função da proporção populacional de cada distrito. Os doentes foram divididos em subgrupos em função da idade: 20-49 anos, 50-59 anos, 60-69 anos; 70-79 anos e acima de 80 anos (10).

A população elegível para a análise foi de 5434 indivíduos, 2025 homens e 3409 mulheres, com uma média de idades de $68,1 \pm 15$ anos. De acordo com os critérios definidos para o estudo, 551 indivíduos (208 homens e 343 mulheres) apresentaram

diagnóstico de IC. Em traços gerais, com estes dados, é possível inferir que nesta população a IC teve uma prevalência estimada de aproximadamente 10% (10).

Através da Figura 2 podemos ver os resultados de prevalência estimada em função dos diferentes grupos etários.

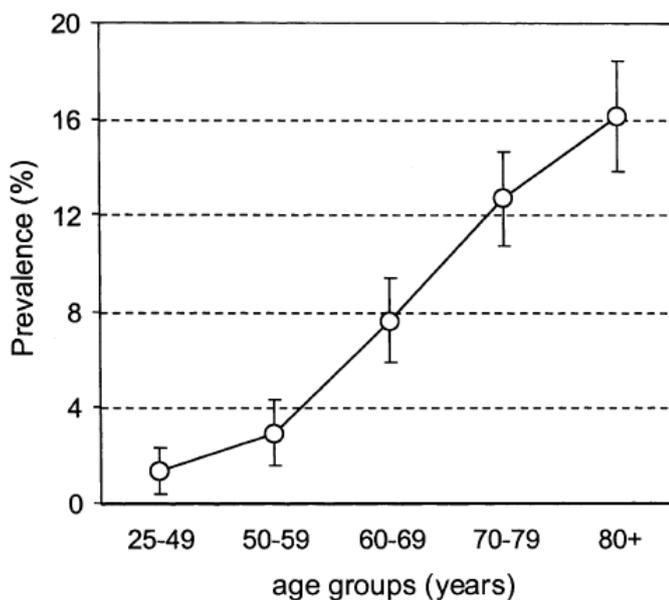
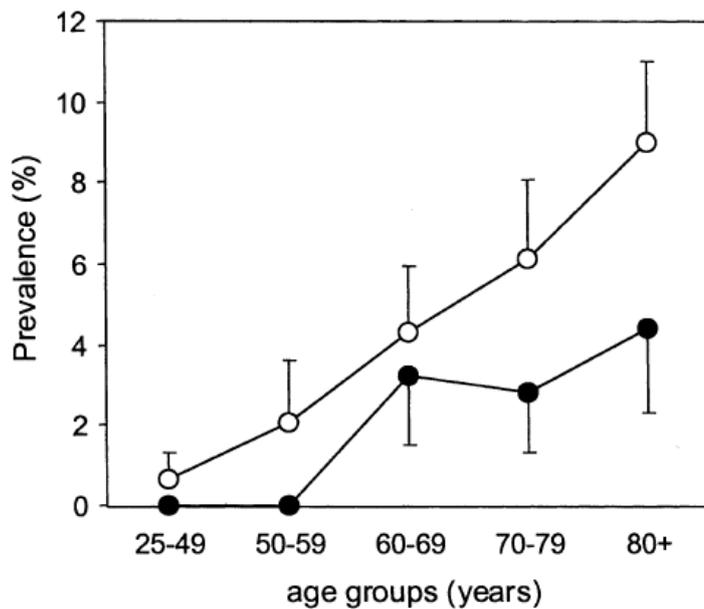


Figura 2 - Prevalência estimada baseada na idade de todos os tipos de IC na população acima dos 25 anos com um Intervalo de Confiança de 95% (10)

Através da análise da Figura 2 verifica-se que existe uma relação direta entre a prevalência e a idade. A prevalência varia entre os 2% no grupo etário mais baixo e pode atingir os 16% nos indivíduos com mais de 80 anos de idade.

Relativamente à análise baseada no sexo e idade, esta foi dividida em função do tipo de IC, ou seja, doentes com IC-FEP e doentes com IC-FER. A Figura 3 mostra os resultados da análise em doentes com IC-FEP.



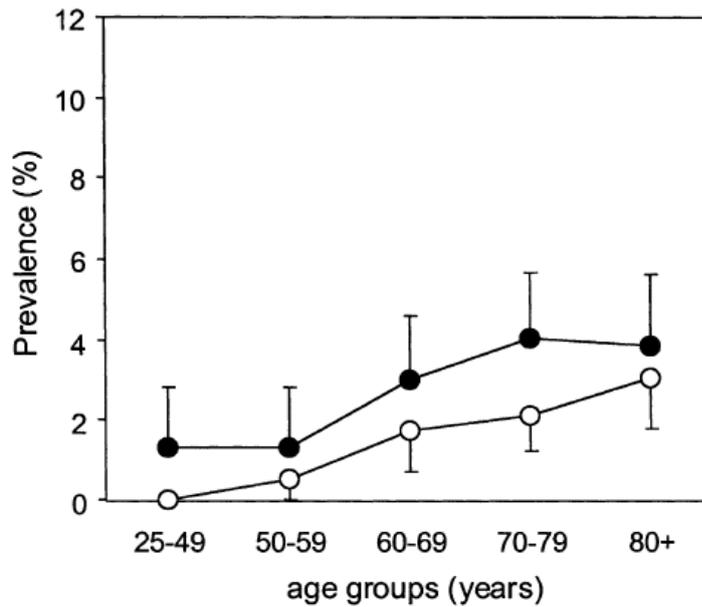
Círculos preenchidos: Homens;

Círculos Vazios: Mulheres

Figura 3 - Taxa de prevalência estimada em doentes com IC-FEP com um Intervalo de Confiança de 95%. Círculos preenchidos: homens; círculos vazios: mulheres (10)

Em doentes com IC-FEP, a prevalência estimada é mais alta no sexo feminino em todas as idades, verificando-se uma diferença maior a partir dos 70 anos de idade.

No que diz respeito a doentes com IC-FER, os resultados estão apresentados na Figura 4.



Círculos preenchidos: Homens;

Círculos Vazios: Mulheres

Figura 4 - Taxa de prevalência estimada em doentes com IC-FER com um Intervalo de Confiança de 95% (10)

No caso de doentes com IC-FER, o sexo masculino assume uma taxa de prevalência estimada ligeiramente superior em todas as faixas etárias.

Numa análise geral, é possível inferir que a prevalência da IC aumenta com a idade em ambos os sexos e tende a ser ligeiramente maior em homens até aos 70 anos, estabilizando acima desta idade. Nas mulheres, a prevalência continua a aumentar com a idade, sendo maior que a prevalência masculina no grupo dos 70-79 anos. Este facto pode ser explicado pela maior esperança média de vida das mulheres e pela perda de proteção cardiovascular em mulheres depois da menopausa.

Limitações do estudo EPICA: (10)

- A amostra da população consiste em indivíduos que recorrem aos cuidados de saúde primários, em vez de ser a população geral;
- Exclusão de consultas de cardiologia onde recorrem doentes com problemas cardíacos.

Vantagens do estudo EPICA: (10)

- Grande abrangência a nível nacional;
- Grande amostra de doentes;

- Inclusão de doentes institucionalizados;
- Avaliação direta por parte do médico de família;
- Uso de métodos objetivos para a avaliação da estrutura e função cardíaca, abrangendo todo o tipo de IC.

I.7 Sintomas e Sinais

Os principais sintomas e sinais da IC estão referidos na Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4 - Sintomas mais típicos e sinais mais específicos da Insuficiência Cardíaca (I)

Sintomas mais típicos	Sinais mais específicos
Dispneia	Pressão venosa jugular elevada
Ortopneia	Refluxo hepatojugular
Dispneia paroxística noturna	Terceiro som cardíaco (ritmo de galope)
Tolerância reduzida ao exercício físico	Deslocamento do impulso apical
Cansaço	Sopro cardíaco
Edema dos membros inferiores	

Tabela 5 - Sintomas menos típicos e sinais menos específicos da Insuficiência Cardíaca (I)

Sintomas menos típicos	Sinais menos específicos
Tosse noturna	Edema periférico
Pieira	Crepitações pulmonares
Aumento de peso (>2 kg/semana)	Entrada de ar reduzida e macicez à percussão de bases pulmonares (derrame pleural)
Perda de peso (em casos de IC severa)	Taquicardia
Sensação de inchaço	Frequência cardíaca irregular
Perda de apetite	Taquipneia
Confusão (na população idosa)	Hepatomegalia
Depressão	Ascite
Palpitações	
Síncope	

I.8 Diagnóstico

O diagnóstico de IC-FER requer três condições: (I)

1. Sintomas típicos de IC;
2. Sinais típicos de IC;
3. FEVE reduzida.

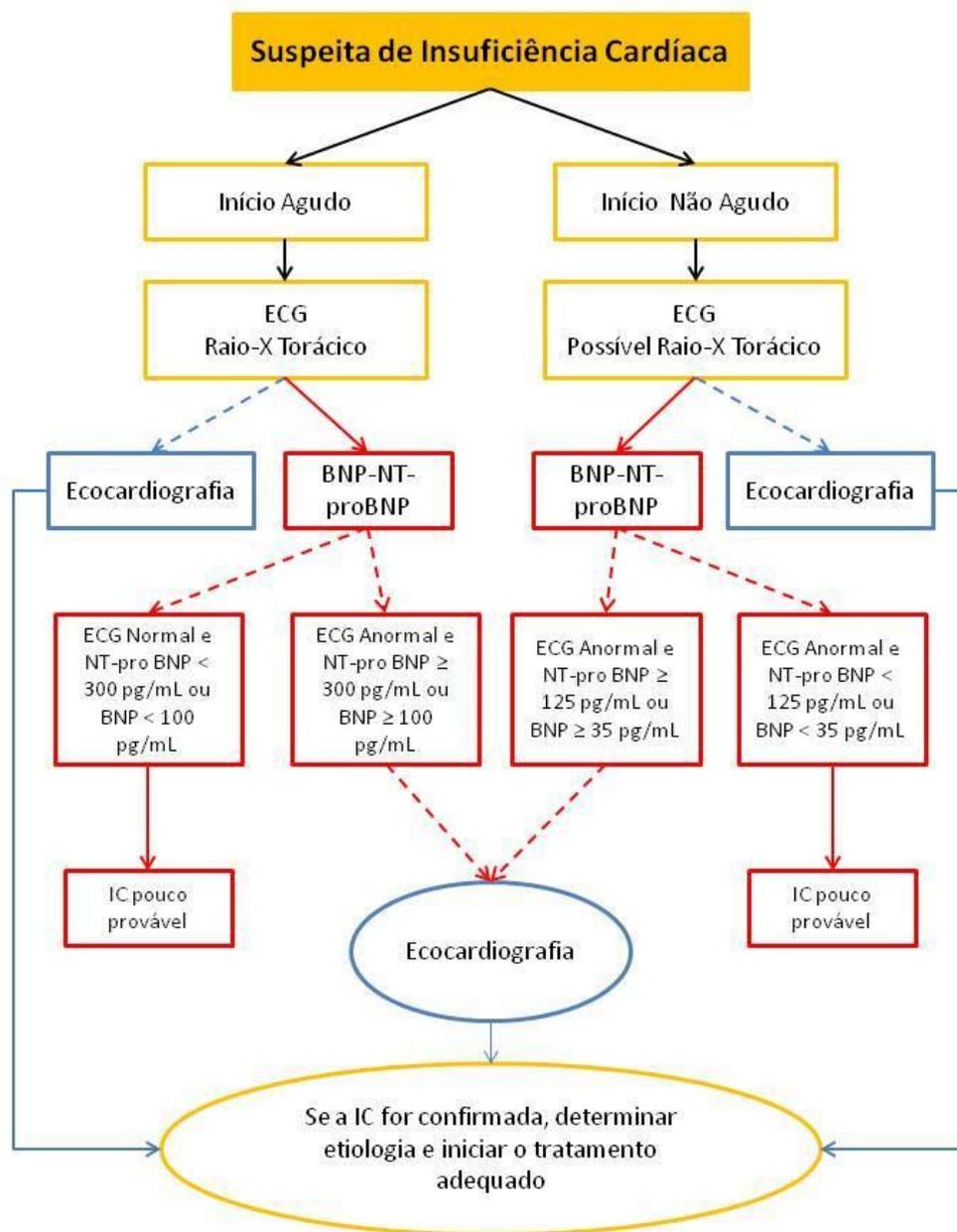
O diagnóstico de IC-FEP requer quatro condições: (I)

1. Sintomas típicos de IC;
2. Sinais típicos de IC;
3. FEVE normal ou apenas ligeiramente reduzida e VE não dilatado;
4. Doença cardíaca estrutural relevante (hipertrofia ventricular esquerda/aumento do VE) e/ou disfunção diastólica.

Algoritmo para o Diagnóstico da IC

Um algoritmo para o diagnóstico da IC ou disfunção do VE está representado na Figura 5 (I).

No caso de doentes que recorrem ao serviço de urgência de um hospital com suspeita de IC e início agudo dos sintomas, a abordagem inicial da ecocardiografia é recomendada. Se os peptídeos natriuréticos forem avaliados, é necessário um valor de *cut-off* mais elevado. No caso de doentes que recorrem aos cuidados primários de forma não urgente e com início gradual de sintomas e sinais de IC, deve ser feito um ECG e avaliados os níveis de peptídeos natriuréticos para identificar os doentes que necessitam realmente de recorrer à ecocardiografia. Nestes doentes, deve ser usado um valor de *cut-off* mais baixo para evitar um diagnóstico “falso-negativo” de IC. Os doentes com grande probabilidade de IC, tais como doentes com história de EAM, devem ser diretamente referenciados para ecocardiografia (I).



- Abordagem inicial da ecocardiografia
- Abordagem inicial dos peptídeos natriuréticos

Figura 5 - Fluxograma para o diagnóstico da Insuficiência Cardíaca. (Adaptado de MCMURRAY, John, et al.; 2012 (1))

1.9 Prognóstico

Muitas variáveis fornecem informação prognóstica e podem ser obtidas diretamente de dados como a idade, etiologia, classe NYHA, FE, co-morbilidades (disfunção renal, *diabetes mellitus*, anemia, hiperuricemia) e concentração plasmática dos peptídeos natriuréticos. Contudo, estas variáveis variam ao longo do tempo tal como o prognóstico. O

prognóstico é particularmente importante aquando do aconselhamento dos doentes sobre dispositivos cardíacos e cirurgia (incluindo o transplante cardíaco) e, se for o caso, no planeamento dos cuidados paliativos dos doentes (I).

1.10 Tratamento Farmacológico da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida

Os objetivos do tratamento em doentes com IC são aliviar os sinais e sintomas, prevenir as admissões hospitalares (recorrência aos serviços de urgência e hospitalizações) e aumentar a sobrevida dos doentes. Embora o foco dos ensaios clínicos tenha sido a mortalidade, atualmente está estabelecido que a prevenção de hospitalizações é importante para os doentes e para os sistemas de saúde (I).

Hoje em dia os ensaios clínicos já possuem *endpoints* primários de eficácia que vão para além da mortalidade, contemplando admissões no serviço de urgência, hospitalizações, necessidade de administração de diuréticos, agentes inotrópicos e vasodilatadores por via IV, EAM, entre outros. Assim, há uma avaliação mais robusta da eficácia do medicamento experimental.

O alívio dos sintomas, a melhoria na qualidade de vida e o aumento da capacidade funcional são também de grande importância. Contudo, raramente são escolhidos para *endpoints* primários na maioria dos EC. Esta situação pode ser justificada pelo facto de estes parâmetros serem difíceis de medir e pela fraca correlação com o aumento da sobrevida dos doentes (I).

A estratégia para o tratamento da IC deve incluir três antagonistas neurohumorais: um IECA (ou um bloqueador dos recetores da angiotensina), um BB e um antagonista dos recetores da aldosterona. Estes fármacos são importantes para modificar a evolução natural na IC sistólica e devem ser considerados em todos os doentes, podendo ser usados em combinação com um diurético para o alívio dos sinais e sintomas de congestão (I).

I.11 Tratamento Farmacológico da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada

Até à presente data, nenhum tratamento evidenciou reduzir efetivamente a morbidade e mortalidade em doentes com IC-FEP. Os diuréticos são usados para controlar a retenção de sódio e água e para aliviar a dispneia e edema (1).

Dois EC de pequenas dimensões (com 30 doentes cada) demonstraram que o verapamil (um bloqueador dos canais de cálcio) pode melhorar a capacidade de exercício e os sintomas em doentes com IC-FEP. Este fármaco pode também ser útil para o controlo da taxa ventricular em doentes com fibrilhação auricular e no tratamento da hipertensão arterial e EAM (o que não acontece no caso de doentes com IC-FER onde o efeito inotrópico negativo pode ser prejudicial). Os BB podem também ser usados para controlar a taxa ventricular em doentes com IC-FEP e fibrilhação auricular (1).

Os pontos a abordar nesta monografia não contemplam o tratamento não farmacológico para a IC. Contudo, é importante salientar que no tratamento da IC pode ser necessário recorrer a dispositivos cardíacos ou até ao tratamento cirúrgico.

2. Terapia Génica

Apesar dos avanços significativos no tratamento farmacológico, a IC continua a ser a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Por este motivo, há uma necessidade urgente de descobrir e desenvolver estratégias terapêuticas novas e melhoradas. Neste contexto, a terapia gênica surge como possível solução para o tratamento da IC e para a melhoria da qualidade de vida destes doentes.

2.1 Definição de Terapia Gênica

De acordo com a EMA, um produto de terapia gênica “é um produto biológico que contém uma substância ativa, que contém ou consiste num ácido nucleico recombinante usado ou administrado em humanos com vista a regular, substituir, adicionar ou eliminar uma sequência genética para fins terapêuticos, de profilaxia ou de diagnóstico” (11).

A terapia gênica pode ser classificada em duas categorias: terapia gênica somática e terapia gênica germinal. Na terapia gênica somática, o material genético é inserido em células alvo selecionadas, mas a informação genética não é passada para a próxima geração ao contrário do que acontece na terapia gênica germinal. Esta classificação é de extrema importância uma vez que, até aos dias de hoje, a lei N.º 12/2005 de 26 Janeiro (artigo n.º8), apenas permite terapia gênica em células somáticas (12).

No processo de transferência de genes existem vários fatores a ter em conta para uma correta abordagem ao alvo fisiopatológico. Estes fatores incluem as características biológicas do vetor, as barreiras impostas pela própria fisiopatologia, a escolha do gene, o sistema de entrega do vetor e a abordagem para transferência do gene (*ex vivo* ou *in vivo*) (13).

2.2 Extensão da Transferência de Ácidos Nucleicos para o Coração

Uma questão pertinente aquando da entrega dos vetores no coração é saber quantos cardiomiócitos é suficiente transduzir para obter uma resposta terapêutica. A proporção de células alvo no tecido de interesse que necessita de ser geneticamente modificada para modificar favoravelmente a fisiopatologia em questão é de grande importância. Dentro desta questão estão considerações de eficácia da tecnologia de transferência de ácidos nucleicos e o método de entrega utilizado. Como exemplo, a criação de um *pacemaker* biológico que

requer apenas modificações genéticas num pequeno número de células cardíacas e, em contraste, a recuperação da contractilidade do miocárdio num contexto de IC que requer uma transferência de genes eficaz para a maioria das células alvo (13).

A história natural da doença terá um grande impacto no tempo necessário para a expressão do transgene. O padrão de expressão do transgene necessário irá determinar a escolha do sistema de transferência a ser aplicado para obter o resultado desejado. A necessidade de uma expressão contínua para condições como a IC é inerente à natureza irreversível da fisiopatologia subjacente (13).

2.3 Estratégias de Entrega de Ácidos Nucleicos

Os sistemas de entregas de ácidos nucleicos podem ser classificados em duas categorias: sistemas físico-químicos não virais e sistemas virais recombinantes (14).

As vantagens dos sistemas não virais incluem a facilidade de produção do vetor, a reduzida limitação no tamanho da “cassete de expressão” e os riscos de biossegurança mínimos. Por outro lado, as limitações fazem parte a baixa eficácia de transfecção e o efeito transiente devido à degradação intracelular. As vantagens dos sistemas virais incluem a alta eficácia na transferência de genes e a capacidade de expressão dos transgenes por longos períodos de tempo (quando são usados vírus integrativos). As principais limitações são a reduzida capacidade de “clonagem de sequências longas de ácidos nucleicos”, inconsistências com a bioatividade e pureza entre os *stocks* de vetores e riscos relacionados com a biossegurança (13).

2.4 Investigação Pré-Clínica

A investigação clínica é consequente ao sucesso da investigação pré-clínica. Na Tabela 6 estão representados os principais e mais promissores estudos pré-clínicos.

A análise da tabela abaixo permite confirmar que as proteínas que atuam sobre os níveis de cálcio são os alvos mais promissores para o tratamento da IC com terapia génica e que a SERCA2a assume um papel de destaque neste grupo de alvos terapêuticos. No caso da SERCA2a, os estudos pré-clínicos foram realizados em ratos, porcos e ovelhas para estudar a melhor via de administração, dose e efeitos terapêuticos e adversos.

Tabela 6 - Sumário dos estudos pré-clínicos com proteínas que regulam o cálcio através da terapia gênica (Adaptado de ZOUEN, F. e BOOZ, G, 2013 (15))

Alvos	Papel	Vetor/Modelo Animal	Objetivo	Estado /Comentários
Adenilato Ciclase	Diminuição indireta da atividade da SERCA2a	Adenovírus-rato/porco	Sobreexpressão	EC Ad5.hAC6 Fase I/II
Recetor Cinase acoplado à Proteína G	Dessensibilização dos recetores β -adrenérgicos	Adenovírus-coelho; AAV6-ovelha	Inibição	Muito promissor
Fosfolamban	Inibição da atividade da SERCA2a	Adenovírus-hamster/ovelha; AAV-rato/hamster/murganho	Subexpressão e/ou limitação da atividade	Promissor (Necessita de otimização)
Proteína Fosfatase I	Inibição indireta da atividade da SERCA2a por defosforilação do fosfolamban	Adenovírus-hamster; AAV9-rato	Subexpressão / Inibição	Promissor (Necessita de mais estudos)
Proteína Al ligadora de cálcio S100	Melhora a atividade da SERCA2a e das proteínas reguladoras do Ca^{2+}	Adenovírus-rato; AAV6-ratos; AAV9-porco;	Sobreexpressão	Muito promissor
Ubiquitina relacionada com o modificador I	Promoção da atividade e estabilidade da SERCA2a	AAV9-murganho	Sobreexpressão	Promissor (Necessita de mais estudos)
SERCA2a	Armazenamento do Ca^{2+} durante a diástole	AAV1 -rato/porco; AAV2-ovelha; AAV6-ovelha	Sobreexpressão	EC AAV1-SERCA2a fase 2b

2.5 Investigação Clínica

O promotor de todos os EC de terapia gênica envolvendo a SERCA2a é a *Celladon Corporation*. A *Celladon Corporation* é uma empresa de biotecnologia fundada com o objetivo de desenvolver terapias moleculares para as doenças cardiovasculares, sendo a detentora da patente do AAV1/SERCA2a registada comercialmente como MYDICAR[®]. Este é também o primeiro produto terapêutico desenvolvido por esta empresa.

Na Tabela 7 estão representados os EC com SERCA2a para o tratamento da IC, que representam o estado da arte na terapia gênica na IC.

Tabela 7 - Ensaio Clínicos com SERCA2a na Insuficiência Cardíaca (Adaptado de ZOUEN, F. e BOOZ, G., 2013 (15))

Ensaio Clínicos			
Identificação	NCT00454818	NCT00454818	NCT01643330
Acrónimo	CUPID	CUPID	CUPID
Promotor	<i>Celladon Corporation</i>	<i>Celladon Corporation</i>	<i>Celladon Corporation</i>
Conceção do Estudo	Aberto, Escalonamento de doses	Randomizado, Duplamente Oculdo, Controlado com Placebo	Randomizado, Duplamente Oculdo, Controlado com Placebo
Outcomes	Segurança e Eficácia	Segurança e Eficácia	Eficácia
Medicamento Experimental / Vetor	MYDICAR® (AAVI-SERCA2a)	MYDICAR® (AAVI-SERCA2a)	MYDICAR® (AAVI-SERCA2a)
Doses (DRP)	1,4x10 ¹¹ 6x10 ¹¹ 1x10 ¹¹	6x10 ¹¹ 1x10 ¹¹ 1x10 ¹³	1x10 ¹³
Administração	Intracoronária	Intracoronária	Intracoronária
Fase	1	2	2b
Número de doentes - Estado	9 doentes - completo	39 doentes - completo	200 doentes - recrutamento ativo
Resultados	Positivos	Positivos	NA

Na área das doenças cardiovasculares, a IC é a condição com maior desenvolvimento na terapia génica com particular destaque para o alvo SERCA2a. Atualmente, estão concluídos dois EC com as características supracitadas: um EC fase 1/2 e um estudo fase 2. Seguidamente será feita uma análise detalhada destes EC, que constituem o estado da arte nesta área. Esta análise contemplará uma avaliação crítica dos pontos mais importantes no que diz respeito ao desenho do estudos e à validade interna e externa dos mesmos bem como uma avaliação da qualidade metodológica dos dois estudos publicados até à presente data.

2.6 Vetores

O desenvolvimento de tecnologia de transferência de genes requer um conhecimento detalhado da célula alvo e da biologia do próprio transgene. O desenho do vetor deve ter em conta os padrões temporais e espaciais do processo fisiopatológico cardiovascular em questão. Por exemplo, em regra a concepção de um vetor para tratar a IC deve ter em conta a expressão prolongada do transgene de forma a garantir a melhoria a longo prazo dos resultados. Cada sistema de entrega do vetor é dotado de diferentes especificidades e uma escolha apropriada poderá garantir o sucesso na terapia (16).

Os sistemas de entrega de genes podem ser classificados em duas categorias: sistemas não virais e sistemas virais.

Vetores Não Virais

Os vetores não virais podem ser agrupados em sequências de ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico, sequências de ARN, complexos lipossoma-ácido nucleico (lipoplexos) e complexos polímero-ácido nucleico (poliplexos). Os oligonucleótidos e seus análogos, quer livres quer em complexos, são também um exemplo de vetor não viral. Apesar da relativa ineficácia de transferência de genes para o miocárdio, muitos dos protocolos de terapia gênica em doenças cardiovasculares, sobretudo para terapêuticas que envolvem a angiogênese, são baseados em transferência de genes mediada por plasmídeos (14).

Os benefícios do uso de vetores baseados no ADN plasmídico incluem a fácil produção, o baixo custo e o baixo risco de respostas imunológicas sistêmicas. Contudo, a entrega de plasmídeos ainda não demonstrou um perfil de transfecção adequado. O uso desta tecnologia como ferramenta de transfecção está limitado, devido à rápida degradação sistêmica dos plasmídeos, à dificuldade em entrar nas células e à expressão transitória dos transgenes (16).

A estabilidade dos plasmídeos tem vindo a ser melhorada através da incorporação em sistemas lipossômicos e poliméricos. O uso de complexos lipossoma-ADN confere maior estabilidade ao ADN plasmídico na circulação sistêmica. No entanto, estes complexos também têm problemas, nomeadamente a acumulação no fígado e pulmões, que resulta numa remoção rápida da circulação plasmática. Por outro lado, ao nível celular esta

tecnologia encontra dificuldades ao nível da internalização, saída do endossoma e penetração no núcleo das células quando se trata de ADN (16).

O uso de oligonucleótidos sintéticos para modular a expressão genética em sistemas biológicos tem um grande potencial de investigação e terapêutico. Os oligonucleótidos terapêuticos assumem várias formas tais como moléculas *antisense*, fatores de transcrição “armadilha” e oligonucleótidos catalíticos. Para além das limitações genéricas dos vetores não virais, os oligonucleótidos apresentam problemas de tempos de semi-vida curtos e ligações não específicas a sequências não desejadas (13).

Vetores Virais

O uso predominante de sistemas de vetores virais nos modelos pré-clínicos de terapia génica é reflexo da grande eficácia de transferência genética destes sistemas. Esta eficácia é conferida através das características do vírus biológico usado. Será feita uma discussão dos quatro vírus mais desenvolvidos e usados para terapia génica. Existem outros sistemas virais, contudo o seu uso está limitado a modelos pré-clínicos.

Na Tabela 8 estão referenciados os quatro vírus mais usados em terapia génica e as respetivas vantagens e limitações.

Tabela 8 - Principais vírus utilizados como vectores em terapia génica (17)

Vetores Virais	Integração	Expressão Genética Longa	Resposta Imune	Comentários
Adenovírus	-	-	+	Tropismo alargado; Fácil produção em lotes de dimensão elevada; Bem caracterizado <i>in vivo</i> .
Vírus adeno-associados (AAV)	- (Residual)	+	-	Capacidade de clonagem limitada; Não patogénico; Integração reduzida mas aleatoria na ausência do gene <i>rep</i> .
Lentivírus	+	+	-	Classe específica de retrovírus com capacidade de transdução de células quiescentes e.g. HIV, EIAV, FIV, etc.
Retrovírus	+	+	-	Apenas infeta células em divisão. Geralmente derivados do vírus da leucemia de Moloney do murganho (MLV).

Vetores Adenovirais

Os adenovírus são vírus de tamanho médio (90-100 nm), icosaédricos e sem envelope compostos por uma nucleocápside e genoma de dupla cadeia linear de ADN. Quando estes vírus infetam uma célula hospedeira introduzem o seu ADN no hospedeiro mas sem o incorporarem no material genético das células do hospedeiro. Assim, a molécula de ADN fica livre no núcleo da célula hospedeira e as instruções desta molécula extra de ADN são transcritas tal como qualquer outro gene (18).

Como resultado do que foi referido anteriormente, o tratamento com adenovírus requer readministrações em populações de células em crescimento. Este sistema vetorial tem mostrado ser promissor no tratamento do cancro e prova disso é o facto do primeiro produto de terapia génica (Gendicine) a obter Autorização de Introdução no Mercado (AIM) ser um adenovírus recombinante para o tratamento de cancro (19).

Os vírus da família *Adenoviridae* infetam várias espécies animais, incluindo humanos. Os adenovírus representam os maiores vírus sem envelope sendo os vírus, com o tamanho máximo, capazes de serem transportados até ao endossoma (a fusão com o envelope não é necessária). O virião tem apenas um único filamento associado a cada base da cápside que auxilia na ligação à célula hospedeira através do receptor *coxsackie-adenovirus* presente na superfície da célula hospedeira tal como se pode observar na Figura 6 (19).

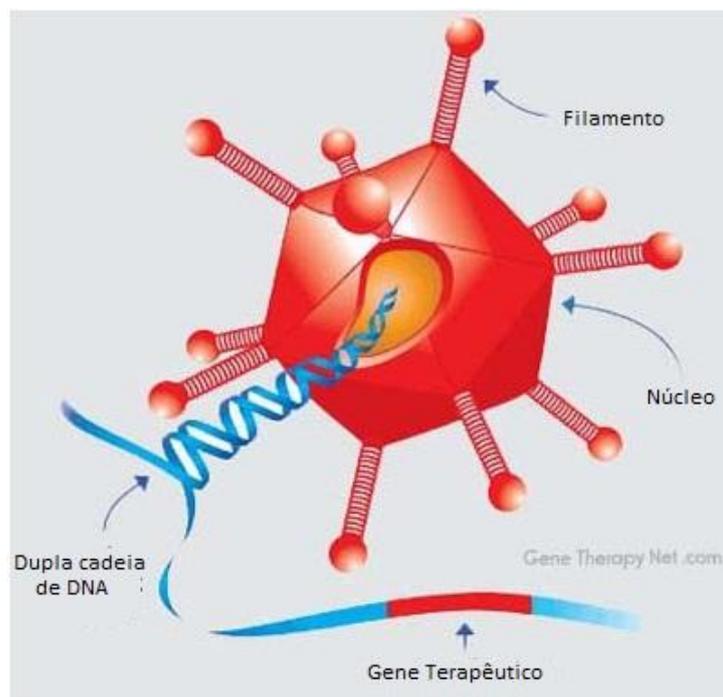


Figura 6 - Organização estrutural de um adenovírus (19)

As diferentes fases da terapia génica com adenovírus estão representadas na Figura 7.

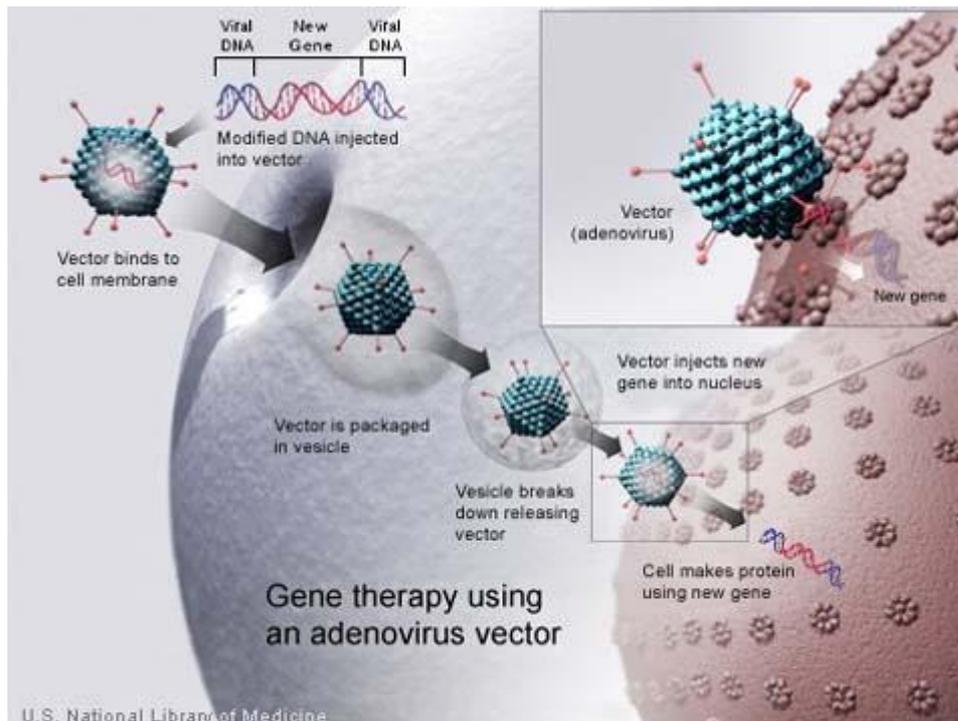


Figura 7 - Fases da terapia génica com vetor adenoviral (19)

O processo começa com a clonagem do ADN modificado de interesse no *backbone* do vetor. Os vetores são produzidos numa linha celular, tipicamente células humanas embrionárias de rim (HEK) transfectadas com um plasmídeo que codifica o backbone viral e o gene de interesse e um ou mais plasmídeos que codificam as proteínas que compõem as partículas virais. Após transfecção as células produzem os vetores virais que são sujeitos a um processo de purificação. De seguida, o vetor é administrado ao doente ligando-se aos recetores na superfície da célula hospedeira. Posteriormente, o vetor funde com um endossoma e é incorporado pelo segundo que o transporta até junto do núcleo. Neste local, ocorre a rutura do endossoma devido à acidificação do meio e o vetor pode finalmente libertar o gene modificado que, através dos poros da membrana nuclear, atinge o núcleo. Nestas condições ocorre a expressão do gene viral em RNA, a partir do qual podem ser geradas novas proteínas de interesse.

Os vetores adenovirais humanos recombinantes são os vetores mais usados em modelos pré-clínicos de terapia génica e em protocolos clínicos de terapia génica cardiovascular. Os pontos fortes deste sistema vetorial que os levam a ser amplamente usados vão desde a fácil produção até ao grande tropismo, particularmente dentro do sistema cardiovascular (18).

As células alvo no sistema cardiovascular incluem também o endotélio vascular e as células do músculo liso. Na presença de um endotélio intacto, a administração intravascular de vetores adenovirais resultará numa entrega genética principalmente para as células endoteliais. Por outro lado, as células do músculo liso podem ser transduzidas com uma eficácia moderada apenas depois de um dano no vaso (13).

Por todas as evidências supracitadas, podemos inferir que os vetores adenovirais têm sido uma ferramenta de investigação bastante útil. Contudo, a translação deste sistema vetorial da investigação básica até à aplicação clínica tem uma série de desafios por várias razões. A morte de um jovem doente que foi diretamente atribuída ao vetor adenoviral usado no EC levou a uma reavaliação da segurança da sua utilização. Os adenovírus têm uma grande capacidade de desencadear reações imunitárias e inflamatórias intensas, o que provavelmente contribuiu para o desenvolvimento deste evento adverso grave. Tal situação também acontece nos modelos animais, onde têm sido reportados eventos tais como inflamação vascular e do miocárdio, disfunção das células endoteliais, vasoproliferação e tromboembolismos (20). Outras barreiras para o uso clínico deste sistema viral incluem a pré-existência de anticorpos neutralizantes para os vetores mais usados e a falta de integração do vetor que limita a expressão do transgene e também resulta na perda de expressão do transgene nas células alvo em divisão (13).

Algumas abordagens têm sido exploradas para aumentar a biossegurança dos vetores adenovirais tal como vetores com quantidades reduzidas de genes virais de tal modo que a atual geração de vetores adenovirais “guttled” são desprovidos destes genes (18).

Vetores de Vírus Adeno-associados

Os vetores derivados dos vírus adeno-associados, designados de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV) são derivados do parvovírus AAV, geralmente do tipo sérico 2, de tamanho pequeno (30 nm) e com genoma de cadeia simples de ADN, com cerca de 4,7 kb (21).

Este sistema vetorial tem como vantagens a ausência de agentes patogénicos, baixa imunogenicidade e expressão estável do transgene por longos períodos de tempo. Estes vetores têm tropismo para o músculo estriado e podem conferir uma expressão do transgene estável por longos períodos de tempo no músculo esquelético e cardíaco em hospedeiros imunocompetentes (21).

Em contrapartida, estes sistemas vetoriais têm problemas relacionados com a pureza e bioatividade dos stocks, uma capacidade de clonagem de transgenes limitada a 4,8 kb e a potencial existência de anticorpos neutralizantes em humanos (22).

A organização genômica do AAV está representada na Figura 8.

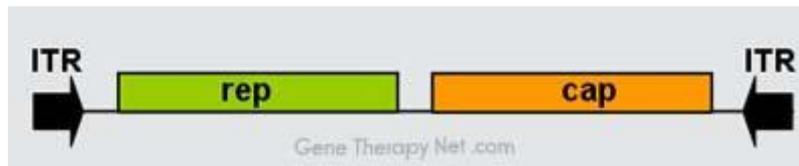


Figura 8 - Organização genômica do AAV (23)

O genoma é constituído por *inverted terminal repeats* (ITR) em ambas as extremidades da cadeia de ADN, e duas sequências de leitura: *rep* e *cap*. A primeira é composta por quatro genes que codificam as proteínas necessárias para o ciclo de vida do AAV, e a segunda contém sequências de nucleótidos para as proteínas da cápside: VP1, VP2 e VP3, que interagem entre si para formar a cápside de simetria icosaédrica.

As sequências ITR são compostas por 145 bases cada. A nomenclatura provém da sua simetria, que foi demonstrado ser necessária para uma multiplicação eficaz do genoma do AAV. As ITR mostraram também ser necessárias quer para a integração do ADN do AAV no genoma da célula hospedeira quer para a encapsulação eficaz do ADN (23).

No que diz respeito à terapia génica, as ITR parecem ser as únicas sequências necessárias em *cis* a seguir ao gene terapêutico: os genes estruturais (*cap*) e de armazenamento (*rep*) podem ser entregues em *trans*. Com este pressuposto foram estabelecidos vários métodos para a produção eficaz de vetores rAAV contendo o gene terapêutico. A produção destes vetores encontra-se esquematizada na Figura 9 (23).

Os AAV têm muitas características que os tornam particularmente adequados como vetores de transferência de genes para o coração. Em primeiro lugar, os AAV transfectam eficazmente células que não se dividem ou que se dividem lentamente, sendo vetores ideais para a transferência de genes para os cardiomiócitos. Em segundo lugar, não há evidência de que os AAV causem doença em humanos e, por isso, os riscos são baixos para os doentes, profissionais de saúde e sociedade em geral. A ausência de genes virais diminui a probabilidade de respostas imunes celulares, permitindo a expressão dos transgenes nas células por longos períodos de tempo. Por fim, os vetores AAV são estáveis num grande intervalo de condições físico-químicas (21).

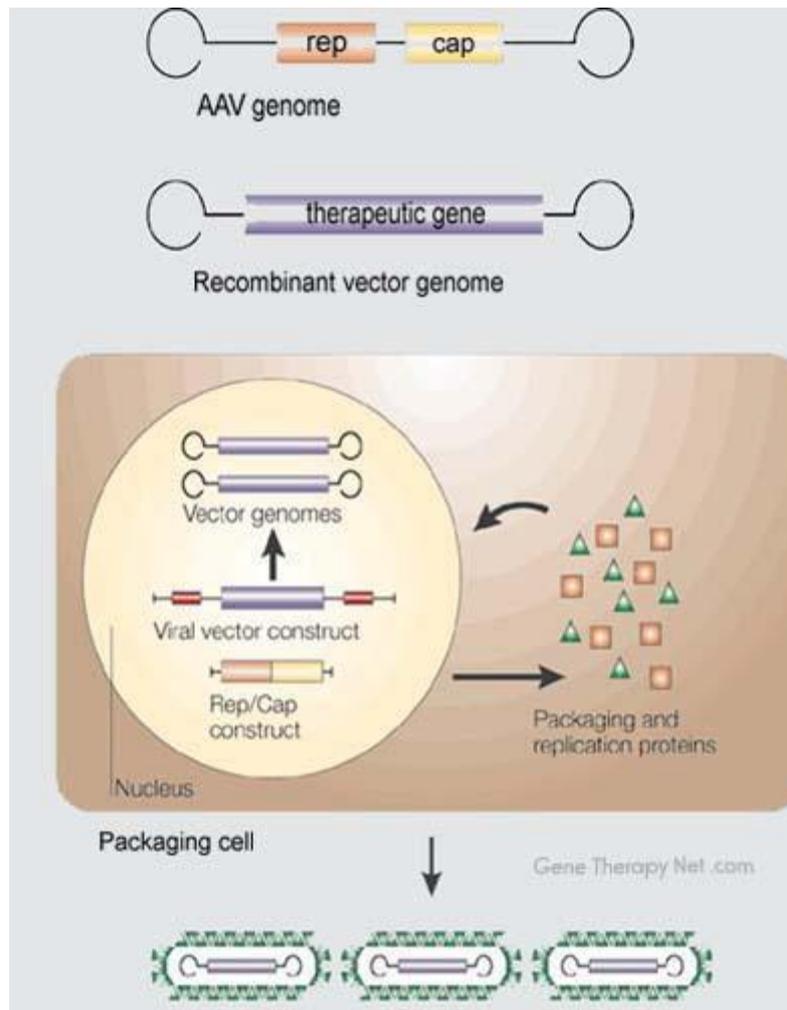


Figura 9 - Processo de produção dos vetores rAAV (23)

No vetor rAAV, o gene terapêutico está intercalado entre os genes *rep* e *cap*, permitindo a produção de proteínas de replicação e de acondicionamento.

Aproximadamente 20-80% da população (percentagem que varia dependendo do serotipo do AAV) apresenta anticorpos neutralizantes para vários serotipos do AAV. Deste modo, o potencial uso terapêutico dos AAVs tem de ter em conta este facto e pode ser um critério de exclusão nos EC que usam este vetor (24).

Vetores Retrovirais

Um retrovírus é qualquer vírus que pertence à família *Retroviridae*. Todo o material genético do retrovírus existe na forma de moléculas de ácido ribonucleico (ARN). Quando um retrovírus infeta uma célula hospedeira, este introduz o seu ARN e também outras enzimas na célula. Esta molécula de ARN pode produzir uma cópia de ADN a partir do seu

próprio ARN graças à enzima transcriptase reversa que estes vírus possuem (25). A Figura 10 evidencia a organização do genoma de um retrovírus.

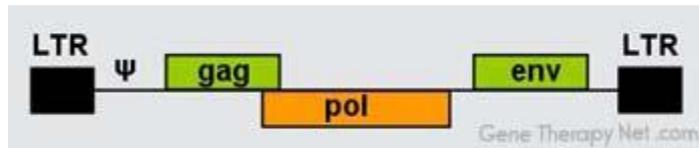


Figura 10 - Organização do genoma de um retrovírus (26)

O *Group-specific antigen* (*gag*) codifica as proteínas estruturais do vírus, a polimerase (*pol*) codifica a transcriptase reversa, a protease e a integrase e o envelope (*env*) codifica as proteínas do envelope.

Todos os processos de integração do retrovírus estão representados na Figura 11 (26).

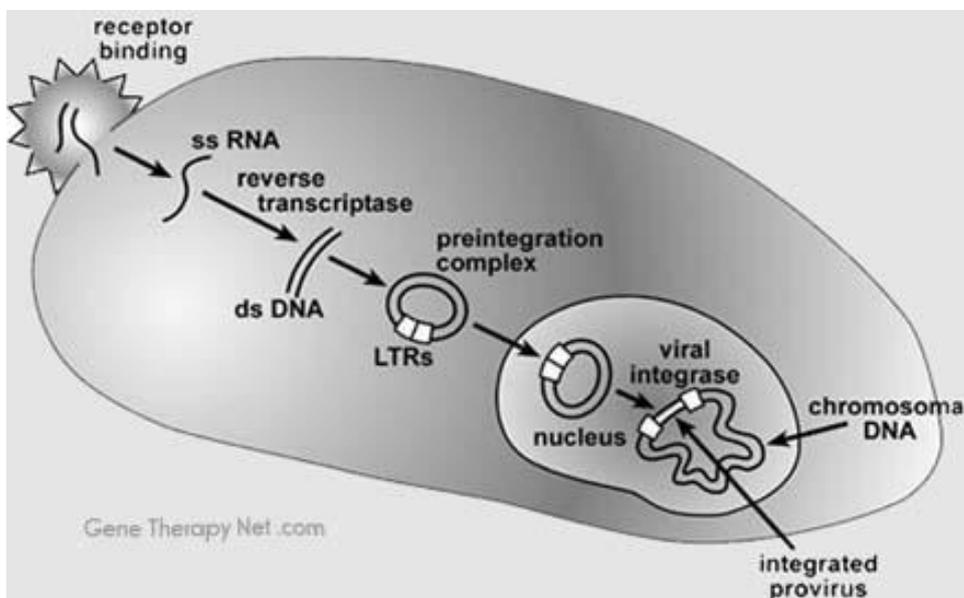


Figura 11 - Processo de integração do retrovírus (26)

O processo de produção de uma cópia de ADN a partir de uma molécula de ARN é designado por transcrição reversa e é mediado por uma enzima, a transcriptase reversa. Após a produção da cópia de ADN e uma vez que esta se encontra livre no núcleo da célula hospedeira, a primeira pode ser incorporada no genoma da segunda. Este último processo é mediado por outra enzima chamada integrase.

Uma vez que o material genético do vírus está incorporado e faz parte do material genético da célula hospedeira, pode dizer-se que a célula hospedeira está modificada. Se esta célula se dividir no futuro, as células descendentes irão todas conter os novos genes (26).

A inserção do gene desejado no ADN do vetor retroviral e a manutenção de uma linha celular de montagem adequada, é atualmente o processo mais simples de preparar vetores retrovirais (Figura 12) (26).

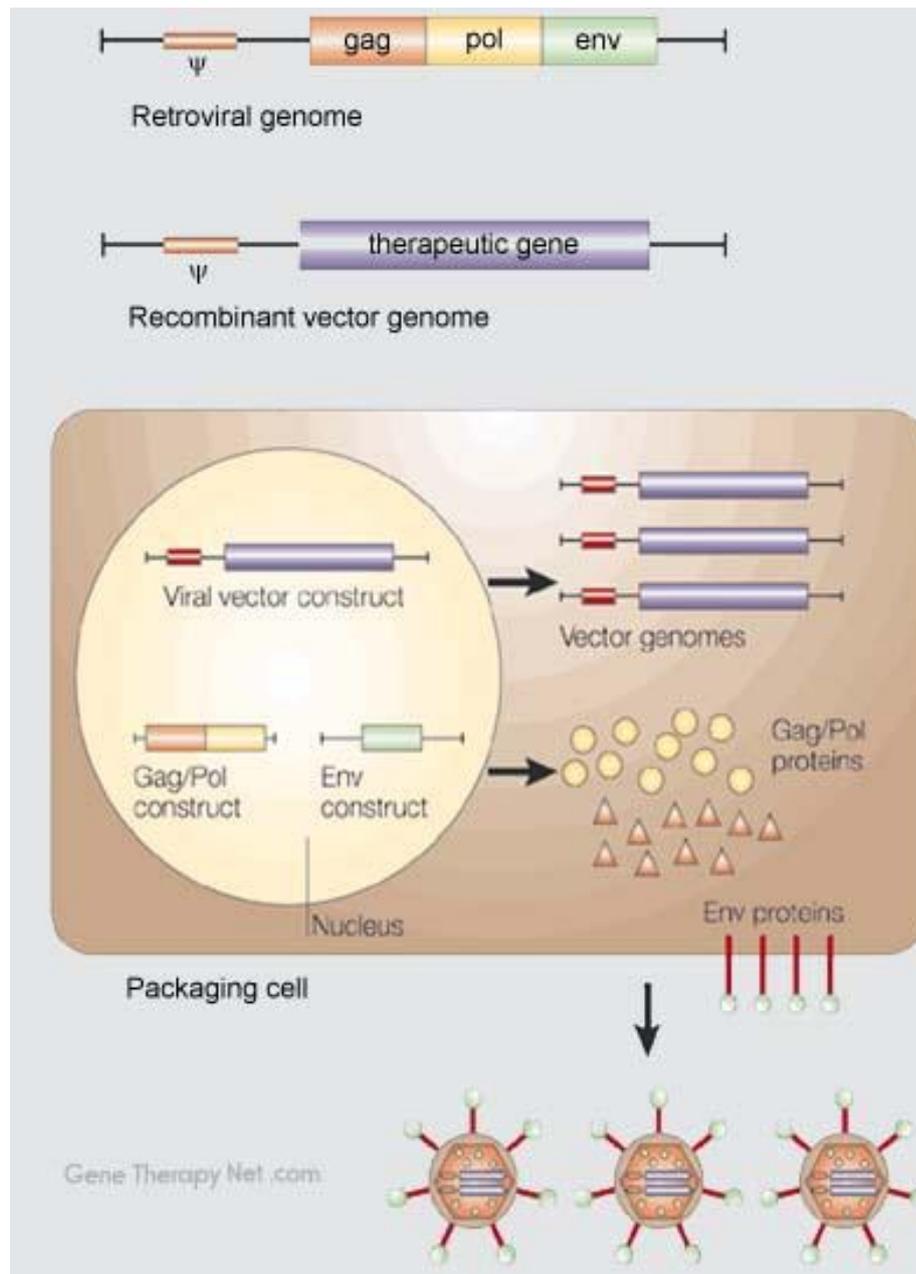


Figura 12 - Processo de produção vetores retrovirais (26)

Os vetores retrovirais são criados através da remoção dos genes *gag*, *pol* e *env*, sendo estes genes substituídos pelo gene terapêutico. Para produzir partículas vectoriais virais é comum utilizar-se uma célula produtora que produz de forma constitutiva as proteínas virais, designada na bibliografia anglo-saxónica de packaging cell line. Estas linhas celulares fornecem todas as proteínas virais necessárias para a produção da cápside e maturação do virião do vetor. Estas linhas celulares de *armazenamento montagem* são modificadas de modo a transcreverem os genes *gag*, *pol* e *env*.

Os vetores retrovirais, baseados nos *Moloney Murine leukaemia virus*, foram desenvolvidos há mais de duas décadas. Estes vetores têm sido amplamente usados em modelos pré-clínicos e foram usados pela primeira vez em EC em 1989 (13).

A maior limitação dos retrovírus é sem dúvida a incapacidade de transduzir em células que não sofrem divisão. Neste sentido, os cardiomiócitos pós-mitóticos e células

quiescentes, tais como o endotélio vascular intacto e células do músculo liso, não podem ser eficazmente transduzidos por estes vetores. Assim, vários investigadores tentam superar esta desvantagem induzindo a proliferação *in vivo* nas células alvo ou adotando uma estratégia *ex vivo* (13).

Dadas estas limitações, o uso deste sistema vetorial em modelos cardiovasculares tem falhado de forma clara. Este insucesso foi também causado pelo crescente uso de vetores adenovirais e outros vetores com capacidade de transdução de células que não sofrem divisão, tais como o rAAV e os vetores lentivirais (21).

No ensaio clínico francês de terapia génica para o tratamento da imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossoma X, 3 das 10 crianças participantes desenvolveram uma proliferação de células T clonais pré-malignas que foi atribuída a uma integração preferencial no gene LMO2 cuja activação causou oncogénese. O risco de mutagénese por vetores integrativos tinha sido previamente considerado mínimo, contudo, veio-se a verificar que os retrovírus derivados dos MLV têm uma integração preferencial em oncogenes específicos (27).

Vetores Lentivirais

O lentivírus é um género da família *Retroviridae* caracterizado por ter um longo período de incubação (25).

O lentivírus é essencialmente uma ferramenta de investigação para introduzir um determinado gene em sistemas *in vitro* ou modelos animais. Estão a ser desenvolvidos procedimentos em larga escala para usar os lentivírus de modo a bloquear a expressão de um gene específico usando a tecnologia de ARN de interferência. A expressão de ARN *short-hairpin* (shARN) reduz a expressão de um gene específico, permitindo assim que os investigadores analisem a necessidade e os efeitos de um dado gene num determinado modelo. Estes estudos podem ser precursores do desenvolvimento de novos fármacos que visam bloquear um gene para o tratamento de uma doença (28).

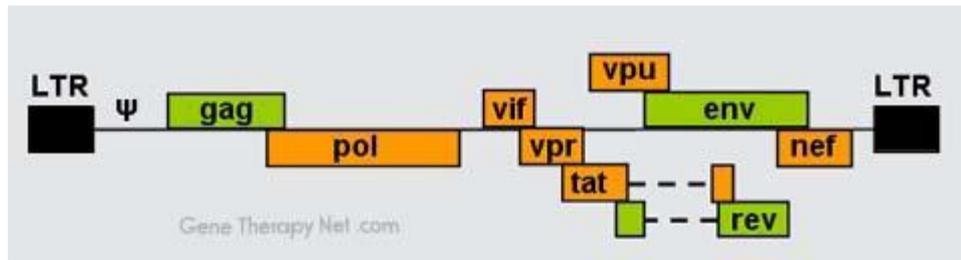


Figura 13 - Organização genômica dos lentivírus (28)

Os lentivírus têm três genes principais que codificam as proteínas virais na ordem: 5'-gag-pol-env. Existem ainda genes acessórios que variam consoante o vírus (por exemplo, para o HIV-1: vif, vpr, vpu, tat, nef) cujos produtos estão envolvidos na regulação da síntese e processamento do ARN viral e outras funções replicativas.

As proteínas virais envolvidas nas fases iniciais da replicação incluem a transcriptase reversa e a integrase. A transcriptase reversa é codificada pela ADN polimerase dependente do ARN. A enzima usa o ARN viral como modelo para a síntese de uma cópia de ADN complementar. A transcriptase reversa tem também atividade de RNase para a destruição do ARN modelo. Já a integrase liga, quer o cADN viral gerado pela transcriptase reversa quer o ADN da célula hospedeira (28).

Os lentivírus, tal como os retrovírus, transduzem as células alvo através da integração genômica. Ao contrário dos vetores retrovirais, estes vetores têm a capacidade de transduzir mitoticamente células quiescentes, uma característica que aumenta a janela de células alvo, particularmente dentro do sistema cardiovascular. O primeiro sistema vetorial lentiviral a ser desenvolvido e o mais usado é baseado no vírus da imunodeficiência humana tipo 1. Dados os problemas de patogenicidade do vírus parental estão a ser estudados vetores lentivirais sem base humana (25).

As principais vantagens deste sistema vetorial incluem a capacidade de estabilidade da expressão do transgene por longos períodos de tempo e a maior capacidade de clonagem (8-9 Kb) comparativamente ao rAAV, o outro vetor integrativo mais usado. No que diz respeito às limitações, estas relacionam-se com problemas de biosegurança (25).

O primeiro EC a usar um vetor lentiviral foi conduzido em 2005. O uso destes vetores tem vindo a aumentar devido às características vantajosas supracitadas. Em resposta a estes desenvolvimentos, o *Recombinant DNA Advisory Committee* tem desenvolvido orientações sobre como conduzir uma avaliação do risco em investigação com vetores lentivirais (28).

3. Alvos para Terapia Génica na Insuficiência Cardíaca – SERCA2a

Num doente com IC, o miocárdio apresenta uma capacidade reduzida de trocas ao nível do Ca^{2+} intracelular, desequilíbrios na fosforilação e alterações nos padrões de expressão de proteínas chave nos cardiomiócitos. Destas alterações faz parte a expressão reduzida do sistema Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático. Esta alteração será o alvo da terapia génica abordada nesta monografia pois é a área onde a terapia génica na IC está mais desenvolvida e mais próxima de ser uma realidade na prática clínica.

3.1 Insuficiência Cardíaca e Homeostasia do Cálcio

A etiologia da IC é variável podendo incluir a doença arterial coronária, hipertensão, infeções, doenças inflamatórias, genética e idiopática. Contudo, numa fase tardia existem características comuns aos cardiomiócitos que incluem desequilíbrios nas trocas de Ca^{2+} , que alteram a expressão e atividade de algumas proteínas reguladoras para os mecanismos de excitação-contração (29).

A regulação dos níveis de Ca^{2+} no citosol das células eucariotas é um processo extremamente complexo uma vez que este ião atua como segundo mensageiro em muitas vias de sinalização celular, o que requer concentrações variáveis de Ca^{2+} . No coração, em particular, o Ca^{2+} não tem apenas o papel de segundo mensageiro, mas é também o responsável pelo processo de contração. Assim, várias proteínas estão envolvidas ativamente nos processos de troca de Ca^{2+} no cardiomiócito, incluindo bombas, canais e proteínas de ligação ao Ca^{2+} (30).

O processo de relaxamento/contração do cardiomiócito está esquematizado na Figura 14.

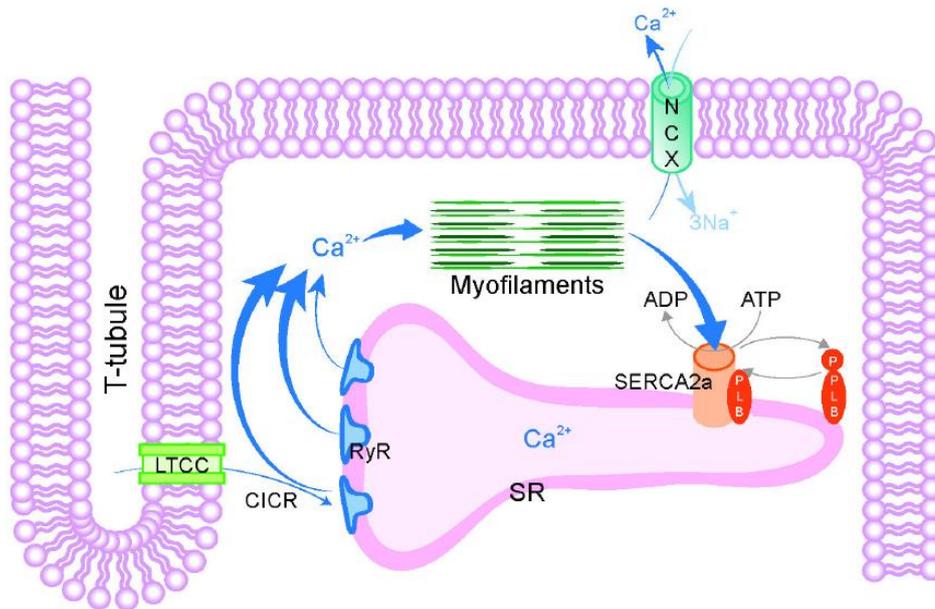


Figura 14 - Sinalização do cálcio durante o processo de relaxamento-contracção (31)

O processo de excitação-contracção é desencadeado por um evento de despolarização que percorre a membrana dos túbulos T e induz a abertura dos canais especializados de Ca^{2+} , ou seja, os canais de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L. A ativação destes canais permite a entrada de uma pequena quantidade de Ca^{2+} para o citosol. Todavia, é necessário salientar que este processo não é suficiente para induzir a ativação dos miofilamentos. No entanto, uma vez que estes canais estão localizados em estreita proximidade com as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático (RS), o Ca^{2+} pode chegar ao recetor rianidina (RyR2) localizado na membrana do organelo celular desencadeando, assim, a libertação em massa de Ca^{2+} do RS para o citosol (32). Com o processo supracitado, a concentração intracelular de Ca^{2+} aumenta de 0,1 até 1 μM . O Ca^{2+} libertado pode iniciar o processo de contracção com o *cross-bridge cycling* quando a troponina C é exposta às cabeças de miosina e se une aos filamentos de actina. O fim deste evento baseia-se na rápida e eficiente remoção do Ca^{2+} do citosol (33).

3.2 Isoformas da SERCA

Nos mamíferos, a família SERCA inclui várias isoformas codificadas em três genes diferentes (SERCA1, 2 e 3). O gene SERCA1 (ATP2A1) está localizado no cromossoma 16p12 e dá origem a dois subtipos por *splicing* alternativo: SERCA1a e SERCA1b. Estas proteínas são respetivamente as isoformas adulta e neonatal da SERCA presente no músculo esquelético dos espasmos rápidos (34; 35; 36).

O gene SERCA2 (ATP2A2 no cromossoma 12), pelo contrário, codifica um transcrito que, através de *splicing* alternativo, pode dar origem a três isoformas diferentes da proteína SERCA2: SERCA2a, 2b e 2c. As SERCA2a e 2b são principalmente expressas no músculo cardíaco/contracção lenta e no músculo liso, respetivamente. Já a SERCA2c tem sido detetada no epitélio, mesênquima e linhas celulares hematopoiéticas bem como nos monócitos primários humanos. (34; 37) Dada a expressão da isoforma SERCA2a no músculo cardíaco, este será o alvo para a terapia génica na IC abordada nesta monografia.

Relativamente ao SERCA3, este é codificado pelo gene ATP2A3 (cromossoma 17p13). Esta bomba é mais ubíqua pois está presente numa grande variedade de células não musculares em pelo menos 6 isoformas diferentes (34; 38; 39).

3.3 Estrutura da SERCA

De um ponto de vista estrutural, os membros da família SERCA são caracterizados por três diferentes e principais domínios: a grande cabeça virada para o citosol, uma haste e um domínio transmembranar que está presente no lado luminal da membrana do RS. (39) A cabeça inclui o local de ligação à adenosina trifosfato (ATP) e os domínios de fosforilação e atuador (região que funciona como “âncora” para o domínio de ligação de nucleótidos responsável pela desfosforilação) (40).

3.4 Regulação da Atividade da SERCA

Tal como já foi referido, a SERCA2a é a isoforma da SERCA mais abundante no coração. A atividade desta bomba é especificamente regulada pelo fosfolamban (PLN). O PLN é uma pequena molécula presente na membrana do RS e é caracterizado por um domínio regulador hidrofílico e uma região transmembranar hidrofóbica. A interação física entre o PLN e a SERCA2a é mediada por resíduos específicos do domínio transmembranar e pensa-se que interaja diretamente com a SERCA2a ao produzir um efeito inibidor devido a uma alteração na estrutura terciária da molécula. Este efeito resulta numa redução da afinidade do Ca^{2+} com a SERCA2a (41; 42; 43).

Outras moléculas estão também envolvidas na regulação da interação entre a SERCA2a e o PLN sendo exemplos a proteína fosfatase I e o inibidor I. A proteína fosfatase I desfosforila o PLN, o que permite recuperar a sua atividade inibidora ao nível da SERCA2a. A proteína inibidor I regula a proteína fosfatase I interagindo com esta na forma fosforilada. A interação do inibidor I com a proteína fosfatase I bloqueia a atividade da última e tem como resultado o aumento da atividade transportadora da SERCA2a. Por sua vez, o sistema neuro-hormonal influencia a função da SERCA2a através da via β -adrenérgica por fosforilação do inibidor I via proteína cinase A. Por conseguinte, os efeitos inotrópicos do cAMP aumentam e, conseqüentemente, aumenta a estimulação β -adrenérgica na contratilidade dos cardiomiócitos. (44) Alguns destes mecanismos de regulação estão

representados na Figura 15, o que comprova que a SERCA2a é um alvo importante em terapia gênica.

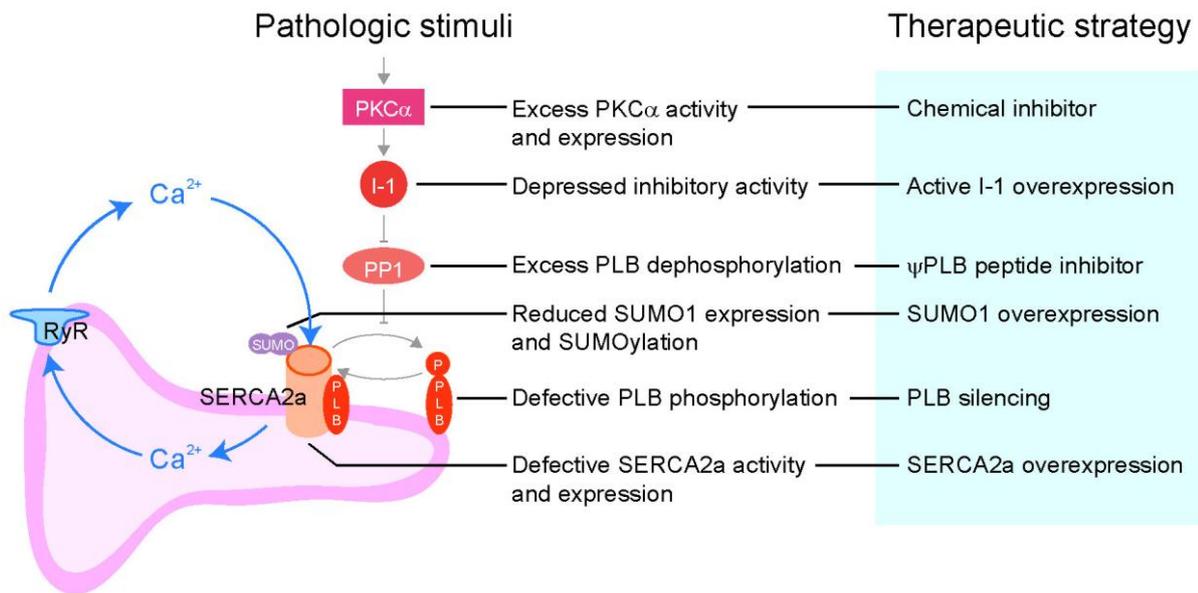


Figura 15 - Atividade da SERCA2a como alvo terapêutico (31)

A redução da recaptação do Ca²⁺ pelo RS resulta numa disfunção sistólica bem como um aumento dos níveis de Ca²⁺ do citosol e suscetibilidade à apoptose. Na IC, a atividade e expressão da SERCA2a está diminuída devido a moléculas moduladoras.

3.5 SERCA na Insuficiência Cardíaca

No coração de um doente com IC, o desequilíbrio ao nível das trocas de Ca²⁺ afeta quer a fase sistólica quer a fase diastólica do ciclo cardíaco. Como consequência das alterações na homeostasia do Ca²⁺, os níveis de Ca²⁺ na diástole tornam-se por vezes elevados e diminuídos na sístole, resultando numa fase de relaxamento prolongada (45).

Vários investigadores têm focado os seus estudos na caracterização da expressão e atividade das proteínas responsáveis pelo controlo do processo de excitação-contração. Na Tabela 9 estão representadas as principais proteínas envolvidas neste processo e o nível de expressão em caso de IC.

Desde a década de 90, vários grupos de investigação concluíram que a SERCA2a está diminuída na IC. Desde então, vários investigadores têm melhorado a atividade da SERCA2a em cardiomiócitos em falência de modo a restabelecer a função cardíaca do coração. Em 1999, a atividade da SERCA2a foi aumentada com sucesso em corações de ratos recém-nascidos recorrendo à sobreexpressão da SERCA2a, utilizando um vetor adenoviral (46) bem como em ratos adultos e cardiomiócitos humanos isolados a partir de um miocárdio em fase avançada de IC (47; 48).

Tabela 9 - Expressão das principais proteínas na Insuficiência Cardíaca (30)

Proteína	Nível de Expressão na IC
SERCA2a	Diminuído
Fosfolamban	Sem alteração
Trocador de N⁺/Ca²⁺	Aumentado
Canal de Cálcio do Tipo L	Sem alteração
Recetor da Rianodina	Sem alteração

Curiosamente, a melhoria na atividade SERCA foi mais significativa no modelo de cardiomiócitos neonatais de rato do que no modelo adulto. A razão para esta discrepância pode ser atribuída ao diferente padrão de expressão do gene da SERCA2a durante o desenvolvimento dos cardiomiócitos. A presença de mRNA do SERCA é significativamente variável durante as diferentes fases de desenvolvimento e, em particular, este aumenta do período fetal até à idade adulta. Durante a fase adulta, o RS pode estar quase totalmente saturado com SERCA e mesmo um aumento da mensagem induzida pela transferência de genes pode não produzir efeitos com a mesma magnitude que se observa nos cardiomiócitos dos ratos recém-nascidos (49).

As abordagens farmacológicas que aumentam a função inotrópica do coração não foram totalmente bem sucedidas. Tal foi associado ao aumento da mortalidade e do risco de morte súbita. A reconstituição da SERCA2a para níveis próximos dos níveis fisiológicos no modelo de rato normalizou o volume ventricular esquerdo e a função cardíaca sem causar os efeitos adversos associados à terapêutica inotrópica convencional (45).

O PLN é um alvo bastante atrativo para melhorar a atividade da SERCA2a na IC. Diversas abordagens têm sido estudadas incluindo anticorpos miméticos do PLN, sequências *antisense* e formas mutantes da molécula. Estes estudos salientam a importância de manter o ratio de PLN/SERCA para sustentar a função cardíaca, quer em modelos animais, quer em células isoladas de doentes em fase avançada (50; 51).

Dada a grande importância e forte correlação da SERCA2a com o desenvolvimento da IC, este é o alvo mais estudado com terapia génica na IC. Por este motivo, a SERCA2a será o alvo contemplado no estudo do estado de arte desta monografia.

4. Análise dos Ensaio Clínicos

Esta análise terá como base os artigos “*Design of a Phase I/II Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Heart Failure*” (2008) (52), “*Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase I/II Clinical Trial*” (2009) (53) e “*Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) - A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Patients With Advanced Heart Failure*” (2011) (54). Estes são os estudos cujos resultados já foram publicados, sendo assim possível fazer uma análise mais detalhada.

Neste contexto, é importante salientar que existe um estudo a decorrer e cujos resultados ainda não foram aferidos – “*A Phase 2b, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multinational, Multicenter, Randomized Study Evaluating the Safety and Efficacy of Intracoronary Administration of MYDICAR® (AAV1/SERCA2a) in Subjects With Heart Failure*” (55). Contudo, será feita uma análise ao desenho e principais características deste estudo dada a sua grande importância por se tratar de um EC confirmatório que teve por base os estudos iniciais.

4.1 Ensaio Clínico I – “Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase I/2 Clinical Trial”

O estudo CUPID foi o primeiro passo da terapia gênica na investigação clínica na IC. O medicamento experimental usado neste EC é o AAV1/SERCA2a. Trata-se de um vetor AAV recombinante e consiste em 4486 nucleótidos de ADN de cadeia simples que contêm a *cassette* de expressão da SERCA2a humana inserida entre ITRs derivadas do serotipo 2 do AAV (52).

4.1.1 Objetivos

Os principais objetivos do estudo foram: (52)

- Avaliar a segurança e exequibilidade de uma administração por infusão intracoronária e de 3 doses de vetor AAV1 com o transgene SERCA2a em doentes com cardiomiopatia dilatada isquêmica ou não isquêmica e em classe NYHA III/IV;
- Explorar a atividade/eficácia do AAV1/SERCA2a para identificar as doses adequadas para futuros estudos.

Os objetivos do estudo estão em concordância com os objetivos estabelecidos para as fases iniciais de todos os EC. Em estudos de fase I o principal objetivo é avaliar a segurança do medicamento experimental de modo a evitar qualquer tipo de dano nos participantes do estudo em questão e de futuros estudos. Contudo, visto que se trata de um estudo fase I/2, é necessário avaliar os primeiros parâmetros de eficácia para determinar a dose ideal para os próximos estudos. Este parâmetro assume uma elevada importância uma vez que o cálculo da dose para este estudo é baseado nos resultados pré-clínicos ainda que com uma grande margem de segurança.

4.1.2 Visão Global

O estudo CUPID é um ensaio multicêntrico de fase I/2. Trata-se de um estudo aberto, isto é, os investigadores e os doentes têm conhecimento da identidade do medicamento experimental, e de um estudo de escalonamento de dose sequencial (53).

4.1.3 Critérios de Inclusão

No protocolo do estudo foram definidos os seguintes critérios de inclusão: (53)

- Indivíduos entre os 18 e os 75 anos de idade;
- Diagnóstico de cardiomiopatia crônica isquêmica ou não isquêmica;
- FEVE \leq 30%;
- Classe NYHA III/IV num período mínimo de 6 meses anterior à inclusão no estudo;
- Consumo Máximo de Oxigênio (VO_2 máx) \leq 16 mL/kg/min nos 90 dias anteriores à inclusão no estudo;
- CDI implantado há pelo menos 30 dias antes da inclusão no estudo;
- Terapia medicamentosa adequada (IECAs, BB, antagonistas da aldosterona, entre outros).

Pela análise dos critérios de inclusão é possível inferir que estes critérios vão de encontro aos critérios usados nos EC de terapêutica convencional. É importante salientar que todas as etiologias de IC são permitidas, possivelmente para averiguar a influência deste parâmetro nos resultados do estudo. Por outro lado, o valor de FEVE \leq 30% é o padrão a partir do qual se considera que o doente tem uma IC grave, o que se relaciona com o uso de CDI e de classe NYHA III/IV.

Ao contrário da maioria dos EC fase I, no estudo CUPID não é permitida a participação de voluntários saudáveis, tal como acontece, por exemplo, nos EC com antineoplásicos. Esta situação pode ser facilmente justificada pelas características e especificidades dos tratamentos com terapia génica e pelos princípios éticos adjacentes. Estes estudos têm um risco associado bastante superior aos estudos com medicamentos convencionais e não seria ético submeter voluntários saudáveis a esse risco uma vez que não teriam nenhum benefício decorrente da sua participação.

4.1.4 Critérios de Exclusão

De seguida são descritos os principais critérios de exclusão para além daqueles que são transversais a todos os EC: (53)

- Uso de terapêutica IV de inotrópicos positivos, vasodilatadores ou diuréticos nos 30 dias anteriores à inclusão no estudo;

- História de cirurgia cardíaca, angioplastia ou valvuloplastia nos 30 dias anteriores à inclusão no estudo;
- História de EAM nos 6 meses anteriores à inclusão no estudo;
- Sobrevida esperada inferior a um ano, segundo a opinião do investigador;
- Presença de anticorpos (Ac) neutralizantes anti-AAVI no *titer* \geq 1:4 nos 6 meses anteriores à inclusão no estudo.

Grande parte dos critérios de exclusão garante que o doente tem de entrar no estudo com IC compensada de modo a não interferir com os resultados. No que diz respeito ao critério sobrevida esperada inferior a um ano, trata-se de um aspeto bastante importante de modo a evitar uma elevada taxa de *dropouts* (pessoas que abandonam o estudo por morte, retirada do Consentimento Informado, entre outros). Contudo, é de estranhar a admissão de doentes com Ac neutralizantes anti-AAVI visto que este facto pode comprometer a eficácia do tratamento e esses doentes podem não ter qualquer benefício em participar neste EC.

A validade interna e externa dos estudos são aspetos fundamentais na investigação clínica. A validade interna diz respeito à qualidade científica e robustez da metodologia e do desenho do EC, enquanto a validade externa diz respeito à reprodutibilidade dos resultados do estudo para a população alvo. A validade externa é definida pelos critérios de inclusão e exclusão. A validade externa é principalmente importante nos EC fase III (antes da AIM), assim, neste caso, é possível fazer melhorias aos níveis dos critérios de exclusão para garantir a validade externa do estudo.

4.1.5 - Conceção do Estudo

A primeira fase do estudo CUPID é composta por três grupos (coortes) de 3 doentes cada e cujo desenho do estudo está representado na Figura 16 (53).

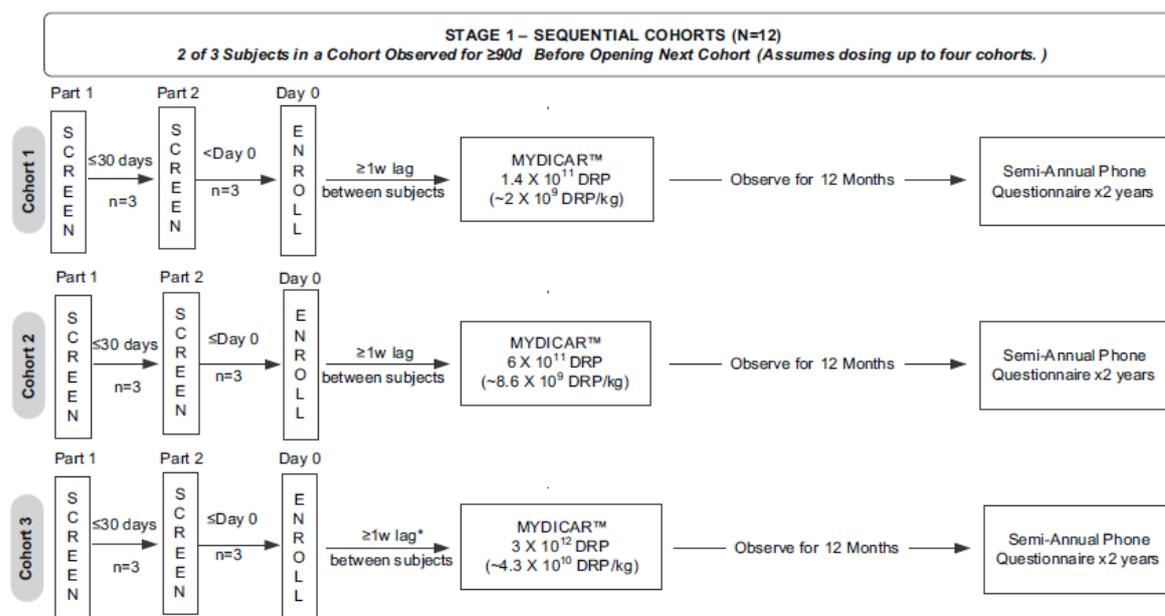


Figura 16 - Representação esquemática do estudo (53)

Os doentes dos diferentes grupos foram avaliados em duas visitas de *screening* com um intervalo máximo de 30 dias. Caso os doentes apresentassem todos os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão, estes podiam ser randomizados e incluídos no estudo (dia 0). Nesse mesmo dia foi administrado o medicamento experimental e os doentes foram contínua e rigorosamente observados no centro por um período mínimo de 18 horas e um período máximo de 24 horas de modo a garantir a segurança dos participantes. Todos os eventos adversos (AE) foram identificados e tratados de imediato se necessário. Após esta avaliação e monitorização inicial, as visitas presenciais foram agendadas para as semanas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e para os meses 2, 3, 6, 9 e 12. Posteriormente a este ano de observação, as visitas presenciais deram lugar a contactos telefónicos, a cada 6 meses durante dois anos.

A amostra total do estudo foi de 9 doentes que foram randomizados para 3 grupos diferentes. Os elementos de cada grupo receberam uma dose diferente do medicamento experimental conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Esquema terapêutico para os diferentes grupos do estudo

Grupo	Dose
1	1,4 × 10 ¹¹ DRP (~2 × 10 ⁹ DRP/Kg)
2	6 × 10 ¹¹ DRP (~8,6 × 10 ⁹ DRP/Kg)
3	3 × 10 ¹² DRP (~4,3 × 10 ¹⁰ DRP/Kg)

DRP: DNAase resistant particles.

Por questões de segurança, nos grupos 1 e 2, o primeiro doente de cada grupo a receber o medicamento experimental foi observado por um período mínimo de uma semana. Se durante esse período não se observassem AEs clinicamente significativos, os segundos elementos do grupo podiam receber o medicamento experimental e o procedimento repetiu-se para os terceiros elementos (52).

No grupo 3, se todos os testes ELISPOT (testes para monitorizar as respostas imunes ao tratamento experimental) fossem negativos no grupo anterior para os dois primeiros doentes durante o mês 3 e para o terceiro doente durante o mês 1, então o doente seria observado durante um período mínimo de uma semana antes de administrar o medicamento experimental ao próximo doente daquele grupo. Por outro lado, se os testes ELISPOT forem positivos no grupo anterior, então o doente era observado durante um período mínimo de 6 semanas antes de se tratar o segundo doente e este era observado pelo menos durante uma semana antes de tratar o terceiro e último doente (52).

Para avançar para o próximo grupo do estudo, dois dos três doentes foram observados por um período mínimo de 90 dias e o terceiro doente observado pelo menos durante 30 dias. Os dados de segurança foram rigorosamente revistos por um Comité de Monitorização de Dados a fim de autorizar ou não o início do estudo nos grupos seguintes.

4.1.6 População do Estudo – Características de *Baseline*

As características de *baseline* do estudo são um aspeto de grande importância para perceber se a distribuição dos doentes pelos diferentes grupos é feita de forma homogénea, de modo a garantir a validade dos resultados e a validade interna do próprio estudo. Caso as características de *baseline* dos doentes participantes no estudo não sejam semelhantes nos diferentes grupos, podemos estar perante um viés de seleção.

Tabela 11 - Características de *baseline* dos doentes (52)

	Cohort 1 1.4 × 10 ¹¹ DRP n = 3	Cohort 2 6 × 10 ¹¹ DRP n = 3	Cohort 3 3 × 10 ¹² DRP n = 3	Total n = 9
Demographics				
Age, y, mean (SD)	53 (7.0)	55 (4.6)	47.7 (9.0)	51.9 (7.0)
Male, n	3	2	2	7
Race, n				
Caucasian	3	3	1	7
African American	0	0	2	2
NYHA status, number (%)				
NYHA Class	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
Cardiac, mean (SD)				
MLWHFQ (points)	46.0 (31.8)	46.3 (20.5)	40.7 (20.2)	44.3 (21.6)
6-min walk (meters)	376.7 (29.3)	421.7 (129.3)	386.3 (115.2)	394.9 (90.2)
VO ₂ max (mL·kg·min)	14.6 (2.5)	13.0 (2.8)	14.9 (2.9)	14.2 (2.5)
LVESV (mL)	213.3 (44.9)	252.0 (86.6)	210.7 (47.4)	225.3 (57.8)
LVEF (%)	24.3 (6.0)	20.3 (4.5)	22 (3.6)	22.2 (4.5)
NT-Pro BNP (pg/mL)	1857 (1369)	3084 (1954)	10644 (17373)	5195 (9688)
Medical history, number				
Coronary artery disease	2	1	1	4
Diabetes mellitus	1	0	2	3
Hypertension	1	0	2	3
Previous MI	2	1	1	4
Physical findings, mean (SD)				
Systolic blood pressure (mm Hg)	105.3 (20)	98.0 (5.3)	105.3 (4.2)	102.9 (11.2)
Diastolic blood pressure (mm Hg)	69.3 (1.2)	68.3 (10.4)	79.0 (1.7)	72.2 (7.4)
Body weight (kg)	94.0 (17.7)	85.0 (13.6)	94.7 (21.1)	91.2 (16.0)

DRP, DNase resistant particles; NYHA, New York Heart Association; MLWHFQ, Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire; VO₂ max, maximal oxygen uptake; LVESV, left ventricular end-systolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; MI, myocardial infarction.

As características de *baseline* estão genericamente divididas em cinco domínios: demografia, classe NYHA, parâmetros cardíacos, história médica e parâmetros físicos.

As características demográficas são, no geral, equiparáveis entre os três grupos, com exceção da raça, pois o grupo 3 possui 2 doentes de raça afro-americana. Estes doentes possuem diferenças genéticas que podem interferir com os resultados do estudo. Numa fase inicial do estudo, as variabilidades devem ser as menores possíveis.

No domínio dos parâmetros cardíacos, o NT-Pro BNP é um dado laboratorial bastante discrepante entre os grupos, com uma média de 1857 pg/mL no grupo 1 e uma média de 10644 pg/mL no grupo 3. Esta grande diferença reflete uma maior probabilidade de descompensação da IC no grupo 3 em comparação com os outros grupos. Este parâmetro devia ser mais uniforme através da implementação de um critério de exclusão.

Os restantes parâmetros são uniformes ao longo dos três grupos permitindo assim fazer comparações válidas mediante os resultados obtidos.

4.1.7 Endpoints

A abordagem à análise de eficácia deste estudo é baseada na hipótese de que os benefícios podem não ocorrer em todos os doentes devido aos fatores individuais (anatomia coronária, atividade da SERCA2a) e fatores específicos do processo (entrega eficaz do vetor e transdução). Deste modo, a análise será realizada baseada na resposta do grupo, mas também na resposta individual, sendo categorizada como “bem sucedida”, “sem alterações” e “mal sucedida” (52).

A atividade clínica e biológica bem como o sucesso do tratamento é determinado com base nas tendências entre os grupos dos *endpoints* de eficácia em 5 domínios de eficácia: (53)

1. Função ventricular esquerda e remodelação (FEVE e volume sistólico final);
2. Sintomático (classe NYHA e questionário *Minnesota Living With Heart Failure* (MLWHFQ));
3. Funcional (teste de marcha de 6 minutos e VO_2 máx);
4. Biomarcadores (BNP e NT-proBNP);
5. *Outcomes* clínicos (morte, hospitalizações por IC e recurso a medicamentos inotrópicos positivos, vasodilatadores e diuréticos por via IV).

No que diz respeito à medição da atividade terapêutica em fases iniciais da avaliação clínica, não existe um consenso quanto à metodologia a usar para determinar uma alteração significativa nos estudos de IC. Muitas das terapias para a IC são aprovadas baseadas em resultados de estudos com um grande número de participantes. Contudo, os *endpoints* usados nesses estudos não são exequíveis em fases iniciais com poucos participantes. Por este motivo, foram usados *endpoints* compósitos (53).

Uma vez estabelecidos os *endpoints*, é essencial definir dentro de cada domínio o que constitui uma alteração significativa. As alterações significativas estão apresentadas na Tabela 12.

A natureza, especificidade e robustez dos *endpoints* compósitos são um dos pontos fortes do estudo CUPID. Os *endpoints* estão agrupados em cinco domínios de grande importância na avaliação clínica da IC. Deste modo, é possível diferenciar o nível de evolução em cada domínio e perceber em que domínios o medicamento experimental tem mais impacto. Por outro lado, as alterações significativas estão bem estabelecidas de modo a garantir uma uniformidade dos resultados.

Tabela 12 - Definição das alterações significativas nos endpoints do estudo (53)

Domínio	Alteração Significativa
Função Ventricular Esquerda e Remodelação	<ul style="list-style-type: none">• 5% na FEVE;• 10% ou 20 mL no volume sistólico final.
Sintomático	<ul style="list-style-type: none">• Uma classe na classificação NYHA;• 10 pontos na pontuação total do MLWHFQ.
Funcional	<ul style="list-style-type: none">• 50 metros no teste de marcha de 6 minutos;• 1.5 mL/kg/min no VO₂ máx.
Biomarcadores	<ul style="list-style-type: none">• 35% ou 300 pg/mL (o que acontecer primeiro).

Como na maioria dos EC de fase I, com uma amostra de estudo de tamanho reduzido, as diferenças dos *outcomes* nos diferentes grupos podem não ser estatisticamente significativas. Contudo, as tendências significativas dos *endpoints* dentro dos cinco domínios serão úteis para obter evidência da atividade terapêutica e para desenhar os EC confirmatórios (52).

4.1.8 Resultados

De um modo geral, após a administração de AAVI/SERCA2a, não foram observadas alterações clinicamente significativas nos principais órgãos, pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura corporal e traçado do ECG (53).

Na população total de 9 doentes, foram reportados 37 AEs, 81% dos quais foram classificados com severidade ligeira ou moderada. Como eventos adversos graves (SAEs) foram reportadas hospitalizações por angina instável e por *diabetes mellitus* não controlada. Para além destes eventos destaca-se também a morte de um dos doentes do grupo 2, que apesar de ter melhorado ao nível da classe NYHA (de classe NYHA III para I/II), faleceu por morte cardíaca súbita 96 dias após a administração de AAVI/SERCA2a. Todos os SAEs foram classificados pelos investigadores como não tendo relação com o medicamento experimental (53).

Dos 9 doentes tratados com AAV1/SERCA2a, vários apresentaram melhorias ao nível dos domínios de eficácia desde a *baseline* até aos 6 meses. Cinco doentes melhoraram no domínio sintomático, 4 doentes no domínio funcional, 2 doentes nos biomarcadores, e 5 doentes ao nível da função ventricular esquerda e remodelação. Por outro lado, 1 doente teve um agravamento com significado clínico no parâmetro funcional VO2 máx, 1 doente teve um aumento no NT-proBNP e 1 doente teve uma redução na FEVE (53).

A Figura 17 representa a alteração da FEVE ao longo do estudo. Dois dos doentes (doentes 1 e 3 do grupo 1) apresentaram melhorias ao nível da FEVE. É importante destacar que os doentes com Ac neutralizantes para o AAV1 (doente 3 do grupo 3 e doente 2 do grupo 1) apresentaram uma diminuição na FEVE de grande relevância clínica. Este resultado pode ter sido fortemente influenciado pela presença dos Ac neutralizantes (53).

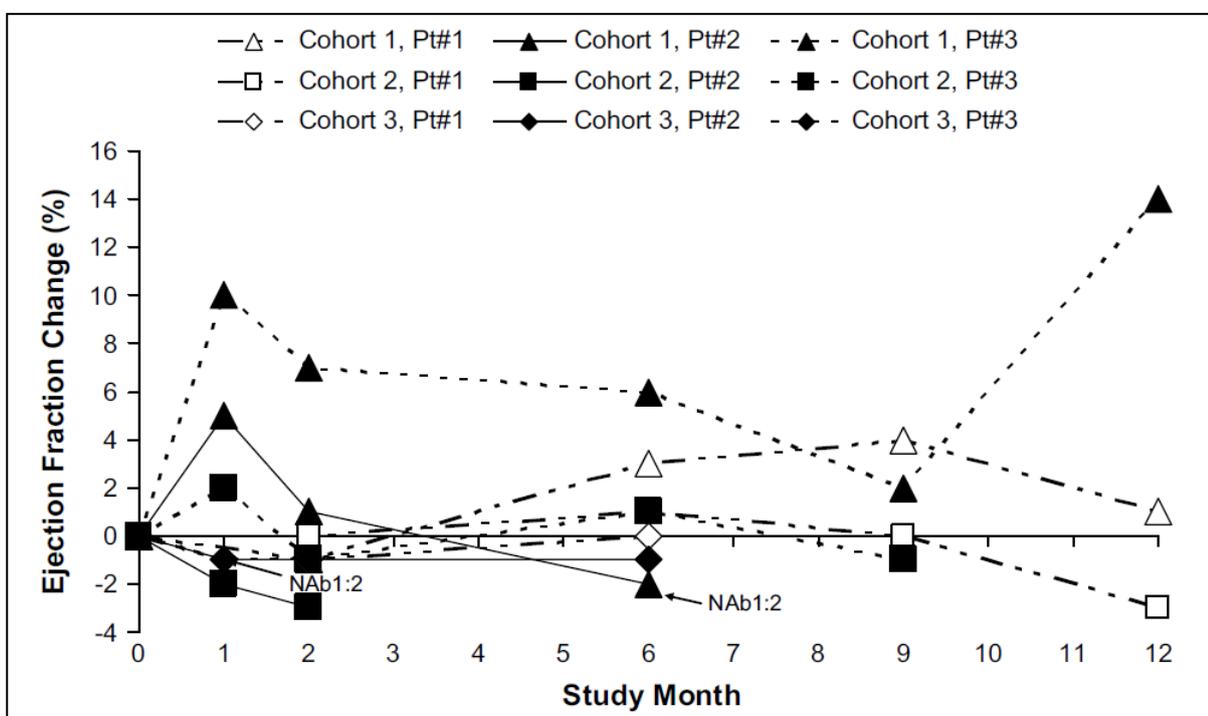


Figura 17 - Alteração absoluta da FEVE ao longo do tempo (53)

A evolução do domínio sintomático avaliado através da classificação NYHA está representada na Figura 18. De um modo geral, a maioria dos doentes apresentou uma melhoria ao nível dos sintomas da IC, ou seja, houve uma diminuição da classe NYHA.

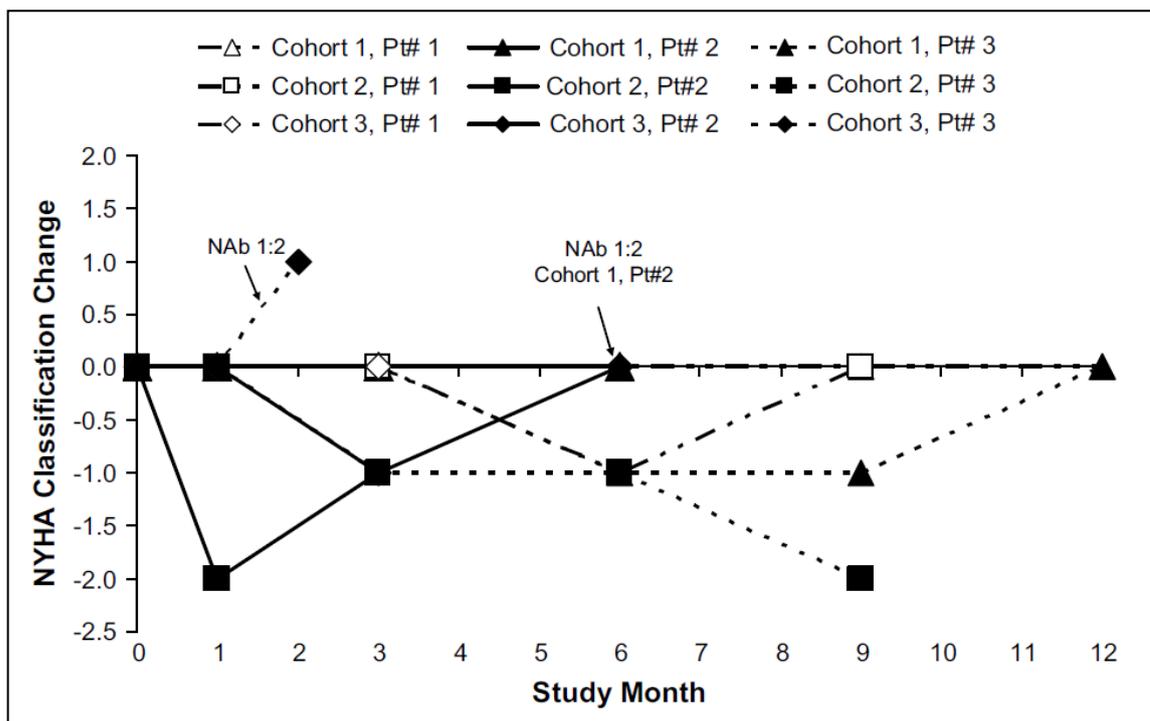


Figura 18 - Alterações da classe NYHA ao longo do tempo (53)

Relativamente ao domínio funcional, a evolução ao nível do teste de marcha de 6 minutos está representada na Figura 19. Neste parâmetro houve também uma melhoria, principalmente nos doentes 1 do grupo 1 e 3 do grupo 2. Nestes dois casos, houve um aumento acima dos 50 metros, o que constitui uma alteração significativa.

Por fim, para analisar o domínio dos biomarcadores é necessário avaliar a alteração do NT-proBNp representada na Figura 20. Neste caso houve também uma clara melhoria na maioria dos doentes. A única melhoria significativa é referente ao doente 3 do grupo 1 cuja redução é cerca de 60% (acima dos 30% definidos para alteração significativa). No entanto, é importante salientar que o doente 1 do grupo 2 tem uma melhoria muito próxima dos 30%.

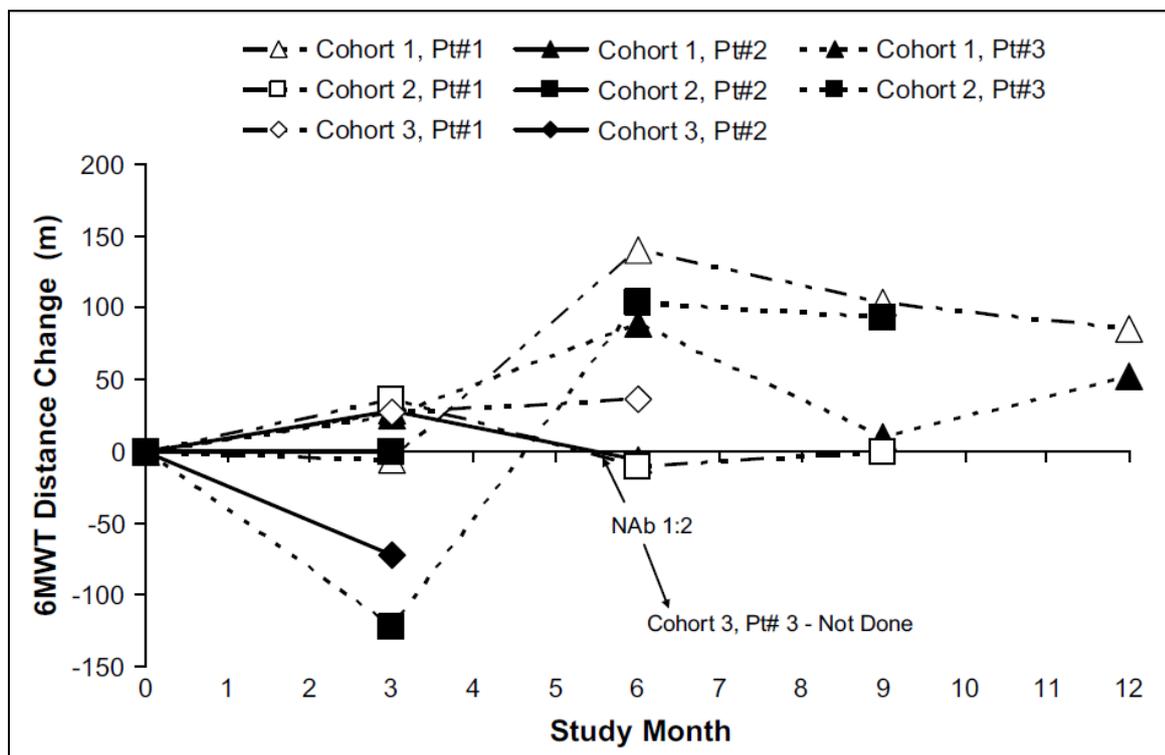


Figura 19 - Alterações nas distâncias percorridas no teste de marcha de 6 minutos ao longo do tempo (53)

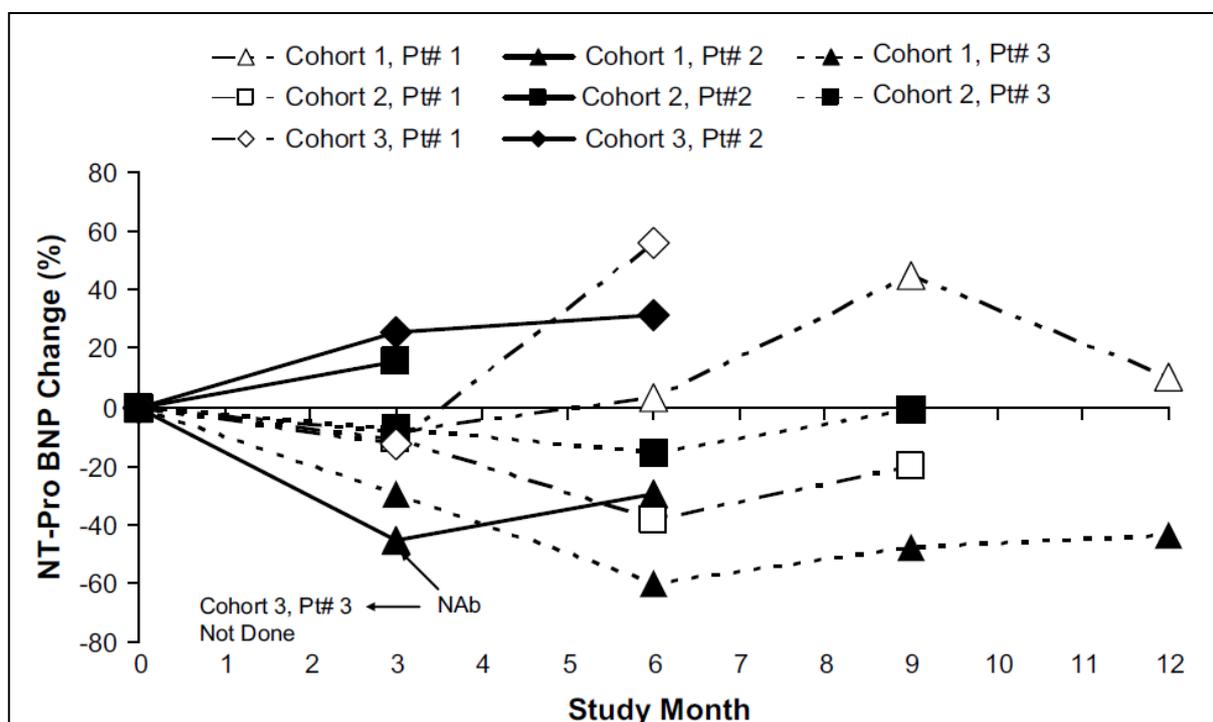


Figura 20 - Percentagem de alteração do NT-proBNP ao longo do tempo (53)

4.1.9 Discussão

O principal objetivo deste EC, demonstrar a segurança do AAV1/SERCA2a, foi atingido. O medicamento experimental demonstrou um perfil de segurança aceitável dadas as altas taxas expectáveis de morbidade e mortalidade na população do estudo. Estes dados estão em conformidade com os dados do perfil de segurança estabelecido para outros vetores AAV recombinantes em EC com um número total de doentes superior a 500 (53).

Tendo em conta os *endpoints* de eficácia, estes revelaram resultados muito positivos ao nível dos vários domínios clínicos. Estes resultados, apesar de promissores, necessitam de ser reavaliados em EC confirmatórios com um maior número de doentes. Nesses estudos posteriores, será fundamental analisar a expressão temporal da SERCA2a, nomeadamente o pico de expressão da mesma.

Um aspeto importante a reter para os próximos estudos é referente à inclusão de doentes com a presença de Ac neutralizantes para o AAV1. Como observado nos gráficos supracitados do estudo CUPID, os dois doentes com esta característica não apresentaram melhorias clínicas. Um dos doentes teve mesmo de ser submetido a um transplante cardíaco no mês 8. Em ambos os casos, as sequências do vetor AAV1/SERCA2a não foram detetadas recorrendo a técnica de PCR. Deste modo, nos próximos EC os doentes com presença de Ac neutralizantes devem ser excluídos do estudo.

Este ensaio clínico permitiu não apenas validar a SERCA2a como alvo terapêutico para o tratamento da IC mas também estabelecer a transferência de genes usando o AAV como estratégia terapêutica no direcionamento para as vias específicas do miocárdio (52).

4.1.10 Avaliação da Qualidade Metodológica

A avaliação da qualidade do artigo selecionado foi feita de acordo com a *guideline* proposta pelo *The centre for reviews and dissemination do National Institute for Health Research* (“Undertaking Systematic Reviews of Research on Effectiveness”).

Os resultados da avaliação da qualidade metodológica do estudo experimental que foi identificado na estratégia de pesquisa estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Avaliação da qualidade metodológica do estudo CUPID fase I/2

Critérios	Avaliação*
<p>1. Was the assignment to the treatment groups really random?</p> <p><i>Adequate approaches to sequence generation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Computer-generated random numbers • Random numbers tables <p><i>Inadequate approaches to sequence generation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Use of alternation, case record numbers, birth dates or week days 	A
<p>2. Was the treatment allocation concealed?</p> <p><i>Adequate approaches to concealment of randomisation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Centralised or pharmacy-controlled randomisation • Serially-numbered identical containers • On-site computer based system with a randomisation sequence that is not readable until allocation • Other approaches with robust methods to prevent foreknowledge of the allocation sequence to clinicians and patients <p><i>Inadequate approaches to concealment of randomisation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Use of alternation, case record numbers, birth dates or week days • Open random numbers lists • Serially numbered envelopes (even sealed opaque envelopes can be subject to manipulation) 	A
3. Were the groups similar at baseline in terms of prognostic factors?	A
4. Were eligibility criteria specified?	A
5. Were outcome assessors blinded to the treatment allocation?	I
6. Was the care provided blinded?	I
7. Was the patient blinded?	I
8. Were the point of estimates and measure of variability presented for the primary outcome measure?	A
9. Did the analyses include an intention to treat analysis?	A
*Avaliação: A - Adequado; PA - Parcialmente adequado; I - Inadequado; D – Desconhecido.	

No geral, o estudo tem uma qualidade metodológica adequada. Os parâmetros classificados como inadequados dizem respeito à ocultação do estudo. Este EC é aberto por se tratar de um estudo com escalonamento de doses. Por este motivo, os parâmetros que foram classificados como inadequados são justificados pela natureza e especificidades do estudo.

A elevada qualidade metodológica confere ao estudo uma grande robustez e credibilidade pelo que os próximos estudos devem igualmente seguir este rigor científico para garantir a validade interna do estudo.

4.2 Ensaio Clínico 2 – “Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) - A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase in Patients With Advanced Heart Failure”

O estudo CUPID fase I marcou a história da terapia génica nas doenças cardiovasculares ao demonstrar a segurança do AAV1/SERCA2a bem como a sua exequibilidade no tratamento da IC. Deste modo, recorrendo aos resultados obtidos no primeiro EC, foi possível desenhar e realizar um EC de fase 2.

4.2.1 Objetivo

O objetivo deste estudo de fase 2 foi avaliar os efeitos de 3 doses de AAV1/SERCA2a em comparação com o placebo numa população de doentes com IC em estado avançado (54).

Uma vez determinado o perfil de segurança do medicamento no EC fase I, é necessário avaliar a eficácia do tratamento. Deste modo, recorre-se ao uso de três doses diferentes do medicamento experimental para determinar qual das doses tem a melhor relação risco/benefício (54).

4.2.2 Visão Global

O estudo CUPID fase 2 é randomizado, duplamente oculto (nem os investigadores, nem os doentes conhecem a identidade do medicamento experimental), controlado com placebo e com grupos paralelos. Nesta segunda fase, o estudo compara o uso de três níveis de dose de SERCA2a administrado por via intracoronária com placebo.

Para demonstrar eficácia são necessárias alterações concordantes em múltiplos *endpoints*, o que resulta numa taxa de falsos positivos muito baixa. Por este motivo, há um grande reforço da validade interna deste estudo conferindo, assim, uma grande robustez aos resultados do estudo (54).

4.2.3 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão são os mesmos do estudo CUPID fase I, com exceção dos seguintes critérios:

- FEVE \leq 35%;
- VO₂ máx \leq 20 mL/kg/min nos 90 dias anteriores à inclusão no estudo.

Estas alterações visam abranger um maior número de doentes a incluir no estudo, o que resultará num aumento da validade externa do estudo. A importância deste parâmetro aumenta com a proximidade de uma possível AIM. Tomando como exemplo a FEVE \leq 35%, este é o critério de inclusão mais utilizado nos EC fase 3 com terapêutica convencional, o que demonstra a intenção deste estudo em aumentar a sua validade externa e a correta extrapolação dos resultados para a população alvo.

4.2.4 Critérios de Exclusão

À semelhança dos critérios de inclusão, os critérios de exclusão permaneceram praticamente inalterados com apenas uma exceção: neste estudo não foi permitida a entrada de doentes com a presença de Ac neutralizantes para o AAVI. Esta decisão foi tomada tendo como base os resultados do estudo de fase I, onde os dois doentes incluídos com a presença de Ac neutralizantes para o AAVI apresentaram resultados pouco favoráveis com o tratamento com o medicamento experimental, comprovando assim que o benefício para estes doentes é inferior comparativamente aos doentes onde o Ac neutralizante para o AAVI não é detetável. Esta alteração é bastante importante e deve ser mantida em estudos futuros de modo a garantir o princípio ético do benefício para todos os participantes de EC.

4.2.5 Desenho do Estudo

Os doentes foram incluídos no estudo em duas fases distintas. Na primeira fase, os doentes foram distribuídos pelo grupo placebo, grupo de dose baixa de AAVI/SERCA2a (6×10^{11} DNase-resistant particles) ou grupo de dose média de AAVI/SERCA2a (3×10^{12} DNase-resistant particles). A dose mais alta de AAVI/SERCA2a (1×10^{13} DNase-resistant particles) foi introduzida no estudo após a revisão dos dados segurança por parte do Comité de Monitorização de Dados (54).

Os processos de recrutamento, randomização e seguimento dos doentes estão representados na Figura 21.

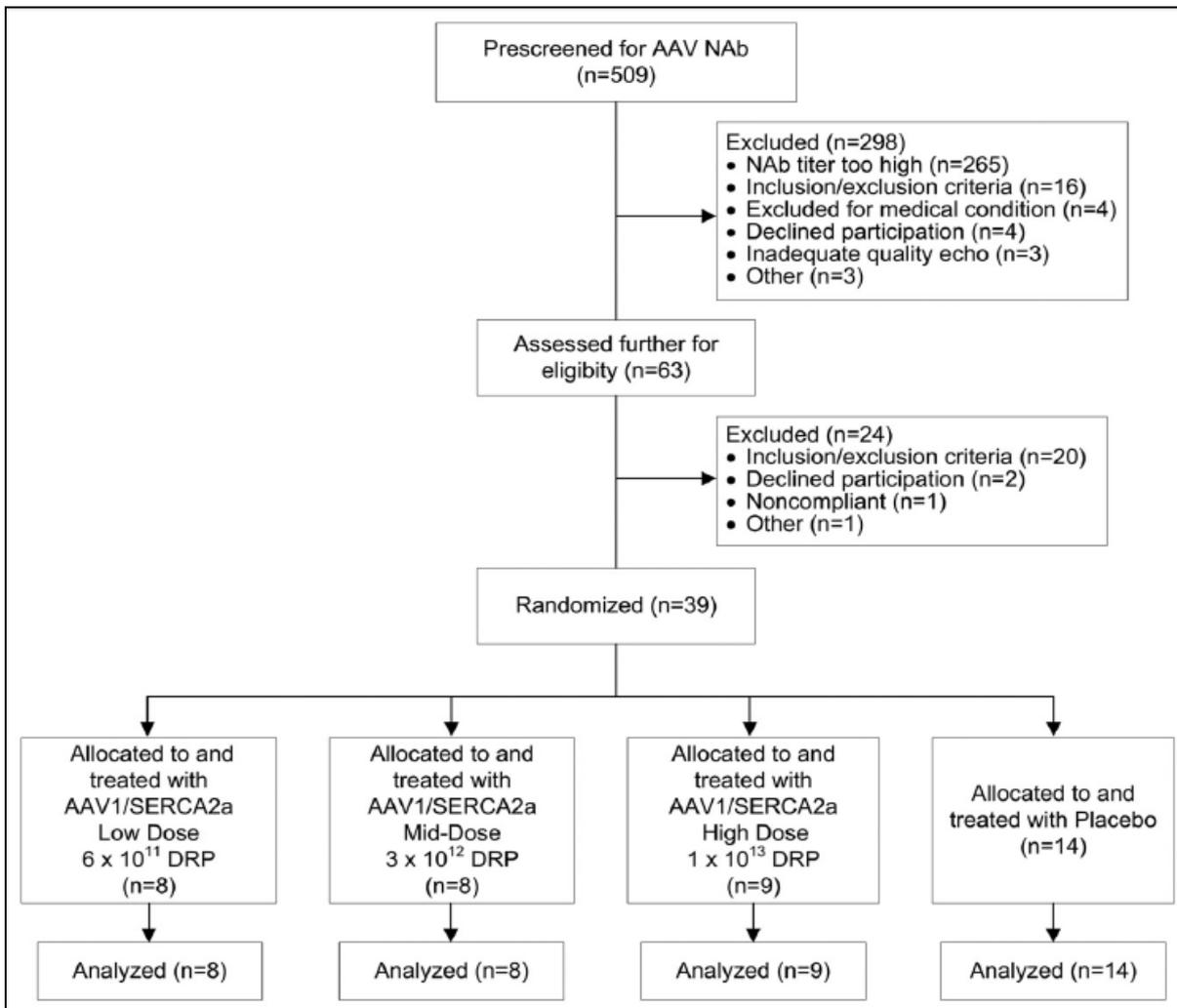


Figura 21 - Fluxograma do recrutamento dos doentes do estudo (54)

Tal como está representado no fluxograma, 1509 doentes fizeram parte do pré-screening do estudo com critérios de inclusão e exclusão pouco restritivos. Este pré-screening teve como objetivo a avaliação da incidência de Ac neutralizantes para o AAV1 numa grande amostra de doentes com IC. Da amostra total, foram randomizados 39 doentes numa proporção de 8:8:9:14 pra os grupos de dose baixa, média, alta e placebo, respetivamente.

4.2.6 População do Estudo – Características de *Baseline*

Tal como foi referido anteriormente no estudo CUPID fase I, as características de *baseline* são fundamentais para garantir uma distribuição uniforme das características clínicas entre os diferentes grupos de modo a não comprometer a validade interna do estudo. Estas

características são igualmente importantes para avaliar a evolução clínica dos doentes desde a randomização até ao final do estudo. As principais informações relativas às características dos doentes estão representadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Características de *baseline* dos doentes (54)

Characteristic	Placebo (n=14)	AAV1/SERCA2a Low Dose (n=8)	AAV1/SERCA2a Mid Dose (n=8)	AAV1/SERCA2a High Dose (n=9)	All AAV1/SERCA2a (n=25)	All Patients (n=39)
Age, mean (SD), y	61.0 (11.9)	60.3 (10.3)	63.9 (8.9)	56.6 (14.0)	60.1 (11.3)	60.5 (11.4)
Sex, n (%)						
Female	1 (7.1)	1 (12.5)	0	3 (33.3)	4 (16.0)	5 (12.8)
Male	13 (92.9)	7 (87.5)	8 (100.0)	6 (66.7)	21 (84.0)	34 (87.2)
Heart failure treatment regimen, n (%)						
Angiotensin-converting enzyme inhibitor	8 (57.1)	6 (75.0)	6 (75.0)	7 (66.7)	19 (76.0)	27 (69.2)
Angiotensin II receptor blocker	4 (28.6)	1 (12.5)	2 (25.0)	2 (22.2)	5 (20.0)	9 (23.1)
Aldosterone antagonist	8 (57.1)	4 (50.0)	3 (37.5)	4 (44.4)	11 (44.0)	19 (48.7)
β -Blocker	14 (100.0)	8 (100.0)	7 (87.5)	6 (66.7)	21 (84.0)	35 (89.7)
Diuretic	12 (85.7)	8 (100.0)	8 (100.0)	8 (88.9)	24 (96.0)	37 (94.9)
Symptomatic, laboratory, functional, and echocardiographic measures						
NYHA class III, n (%)	14 (100)	8 (100)	8 (100)	9 (100)	25 (100)	39 (100)
MLWHFQ total score, mean \pm SD	48.7 \pm 16.4	57.6 \pm 16.4	35 \pm 29.0	41.4 \pm 26.5	44.6 \pm 25.4	46.0 \pm 22.0
Creatinine, mean \pm SD, mg/dL	1.6 \pm 0.6	1.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.6	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	1.3 \pm 0.5
NT-proBNP, mean \pm SD, pg/mL	4072 \pm 3906	1353 \pm 386	3310 \pm 3112	2141 \pm 1997	2268 \pm 2209	2932 \pm 3028
6-Minute walk test, mean \pm SD, m	336 \pm 138	359 \pm 134	334 \pm 117	347 \pm 120	346 \pm 119	343 \pm 124
$\dot{V}O_2$ max, mean \pm SD, mL/kg per minute	12.4 \pm 4.2	14.8 \pm 4.2	14.4 \pm 3.7	15.1 \pm 3.2	14.8 \pm 3.6	13.9 \pm 3.9
LVEF, mean \pm SD, %	22.6 \pm 6.7	25.4 \pm 7.4	26.6 \pm 8.8	27.9 \pm 5.3	26.7 \pm 7.0	25.0 \pm 2.0
LV end-systolic volume, mean \pm SD, mL	201 \pm 64	206 \pm 97	236 \pm 150	169 \pm 48	202 \pm 104	202 \pm 91

AAV1/SERCA2a indicates adeno-associated virus type 1/sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; NYHA, New York Heart Association; MLWHFQ, Minnesota Living With Heart Failure Questionnaire; NT-proBNP, N-terminal prohormone brain natriuretic peptide; $\dot{V}O_2$ max, peak maximum oxygen consumption; LV, left ventricular; and EF, ejection fraction.

Em termos gerais, as características de *baseline* são homogéneas em todos os grupos do estudo em termos de parâmetros demográficos, sintomáticos, laboratoriais, funcionais, ecocardiográficos e de tratamento farmacológico para a IC. Contudo, é importante salientar que o grupo de dose média de AAV1/SERCA2a não possui doentes do sexo feminino. Este facto pode ser explicado pelo reduzido número de doentes do sexo feminino a participar no estudo (5 doentes no total). Adicionalmente, à semelhança do que aconteceu no estudo CUPID de fase I, todos os doentes encontram-se em classe NYHA III à data da randomização no estudo.

4.2.7 Endpoints

Endpoints de Segurança

Relativamente à segurança, esta foi avaliada pela incidência de todos os AEs e SAEs, incluindo eventos cardiovasculares fatais, descompensação da IC, EAM ou hospitalizações

por IC. A descompensação da IC foi definida como a presença de sinais e sintomas de IC que requeiram pelo menos uma das seguintes intervenções: (54)

- Hospitalização;
- Tratamento intravenoso com diuréticos, vasodilatadores ou inotrópicos positivos;
- Remoção mecânica de fluidos;
- Bomba de balão intra-aórtico.

Endpoints de Eficácia

Ao nível da eficácia foi mantida a abordagem do EC prévio, sendo necessárias alterações concordantes em múltiplos *endpoints*, permanecendo também inalterados os diferentes domínios de eficácia: (54)

1. Função ventricular esquerda e remodelação (FEVE e volume sistólico final);
2. Sintomático (classe NYHA e MLWHFQ);
3. Funcional (teste de marcha de 6 minutos e VO_2 máx);
4. Biomarcadores (BNP e NT-proBNP);
5. *Outcomes* clínicos (morte, hospitalizações por IC e recurso a medicamentos inotrópicos positivos, vasodilatadores e diuréticos por via intravenosa).

As alterações significativas foram também estabelecidas quer para a análise de grupo quer para a análise individual. Na análise individual, as alterações significativas são as mesmas estabelecidas no EC fase I. Na análise de grupo, as alterações significativas permaneceram inalteradas em relação às estabelecidas previamente com exceção da FEVE que passa de 5% para 3% (54).

Análise de Grupo

Os grupos de tratamento com AAVI/SERCA2a e o grupo placebo foram comparados através das alterações médias ao longo de 6 meses desde a *baseline*. Para o tratamento ser bem-sucedido foi necessária uma melhoria em 2 ou mais dos 4 domínios de eficácia (excluindo o domínio dos *outcomes* clínicos) em pelo menos um parâmetro dos respetivos domínios. Adicionalmente, nos restantes domínios foi necessário apresentar uma superioridade numérica em relação ao placebo e não apresentar nenhum agravamento clinicamente significativo (54).

Análise Individual

A pontuação numérica de eficácia foi calculada tendo como base o número de parâmetros com alterações clinicamente significativas ao longo de 6 meses. Estas pontuações foram atribuídas a cada parâmetro dos 4 domínios de eficácia para cada doente: (54)

- **+1**: O doente melhorou num parâmetro desde a *baseline* até ao mês 6 e a magnitude da melhoria foi igual ou superior ao limiar de clinicamente significativa;
- **0**: O doente não teve alterações clinicamente significativas;
- **-1**: O doente teve um agravamento num parâmetro desde a *baseline* até ao mês 6 e a magnitude do agravamento foi igual ou superior ao limiar de clinicamente significativa.

Para cada doente, a pontuação total foi calculada através do somatório das pontuações de todos os parâmetros dos 4 domínios de eficácia (classe NYHA, questionário MLWHFQ, teste de marcha de 6 min, VO₂ máx, NT-proBNP, FEVE e volume sistólico final). O intervalo de pontuações possível para cada doente foi de +7 até -7 (54).

4.2.8 Resultados

Resultados de Segurança

Todos os doentes completaram o estudo com um seguimento dos parâmetros de segurança de pelo menos 12 meses. Após a administração de AAVI/SERCA2a, não foram observadas alterações clinicamente significativas nos principais órgãos, pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura corporal, resultados laboratoriais e traçado do ECG (54).

Foram registadas 8 mortes na população do estudo: 4 no grupo placebo (1 durante o período do estudo e 3 no período de seguimento); 3 no grupo de dose baixa (1 durante o período do estudo e 2 no período de seguimento); e 1 no grupo de dose média (durante o período de seguimento). Não foram registadas mortes no grupo de dose alta de AAVI/SERCA2a (54).

Na Tabela 15 estão descritas as taxas de incidência dos SAEs e Aes nos diferentes grupos.

Tabela 15 - Taxas de incidência de SAEs e AEs nos grupos do estudo (54)

Grupo	Taxa de incidência de	Taxa de incidência de
	SAEs	AEs
Placebo	64%	93%
Dose baixa	63%	100%
Dose média	50%	100%
Dose alta	33%	89%

A análise da tabela acima permite concluir que a taxa de incidência de SAEs vai diminuindo à medida que a dose aumenta ao longo dos grupos. A taxa de incidência de SAEs é mais baixa em qualquer um dos grupos de tratamento com AAV1/SERCA2a comparativamente com o grupo placebo. Ao nível dos AEs, estes são na maioria classificados pelos investigadores com severidade ligeira e assumem taxas de incidência elevadas em qualquer um dos grupos.

Todos estes dados de segurança foram favoráveis ao tratamento com AAV1/SERCA2a, reforçando ainda mais que o medicamento experimental tem um perfil de segurança bem estabelecido e é bem tolerado pelos doentes com IC.

Resultados de Eficácia da Análise Individual

Tal como foi referido anteriormente, a análise individual pode ter uma magnitude de pontuação de -7 (maior agravamento) até +7 (maior melhoria). Os resultados de eficácia da análise individual estão representados na Tabela 16 (54).

Tabela 16 - Sumário das pontuações da análise individual de eficácia aos 6 meses (54)

Study Visit	AAV1/SERCA2a Low-Dose	AAV1/SERCA2a Mid-Dose	AAV1/SERCA2a High-Dose	Placebo
Month 6 Overall				
N	8	8	9	14
Mean (SD)	0.9 (2.23)	-0.4 (2.97)	1.1 (1.96)	-1.2 (2.99)
Median	1.0	0.5	1.0	0.0
Range	-4-4	-7-2	-2-4	-7-3
p-value vs placebo	0.102	0.533	0.052	--

Os piores resultados de eficácia a nível individual foram verificados no grupo placebo com uma pontuação média de -1,2. O grupo de dose intermédia obteve também uma média

de pontuação negativa de -0,4. Os resultados de eficácia mais favoráveis a nível individual foram registados no grupo de dose alta com uma média de 1,1. Estes resultados são importantes para avaliar a variabilidade individual na resposta ao tratamento do EC e estabelecer uma comparação com os resultados de eficácia da análise de grupos.

Resultados de Eficácia da Análise de Grupos

Embora se tenha verificado uma melhoria (definida como pelo menos uma superioridade numérica) em alguns parâmetros nos grupos de dose baixa e média, apenas o grupo de dose alta de AAVI/SERCA2a contempla todos os critérios de sucesso do *endpoint* primário na análise dos 6 meses. Os doentes do grupo placebo agravaram a sua situação clínica durante o período entre os 6 e os 12 meses, ao contrário dos doentes no grupo de dose alta que estabilizaram ou melhoraram a sua condição clínica. O agravamento nos parâmetros de eficácia ao longo do tempo no grupo placebo foi associado a uma alta taxa de hospitalizações por IC e ao aumento do risco de eventos cardíacos terminais (54).

Tendo como base o mês 6, limite temporal para a avaliação dos domínios de eficácia, seguidamente são apresentados os gráficos dos resultados dos principais parâmetros analisados (Figuras 22, 23 e 24).

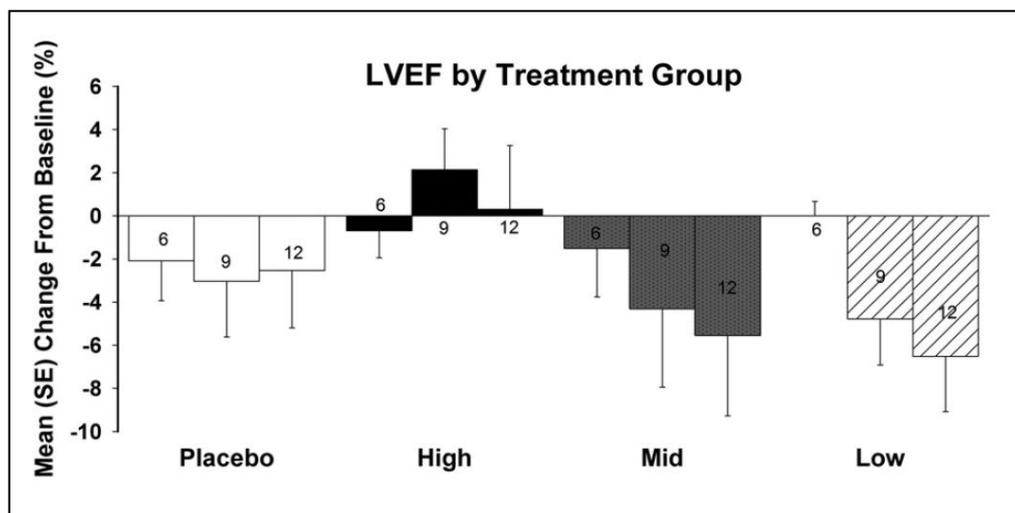


Figura 22 - Alterações da FEVE (54)

No domínio da função ventricular esquerda e remodelação, a FEVE não aumentou substancialmente em nenhum grupo. Contudo, numericamente houve uma maior diminuição no grupo placebo em comparação com o grupo de dose alta ($-2,1 \pm 7\%$ para o grupo placebo versus $-0,7 \pm 4\%$ para o grupo de dose alta; $P=0,17$) (54).

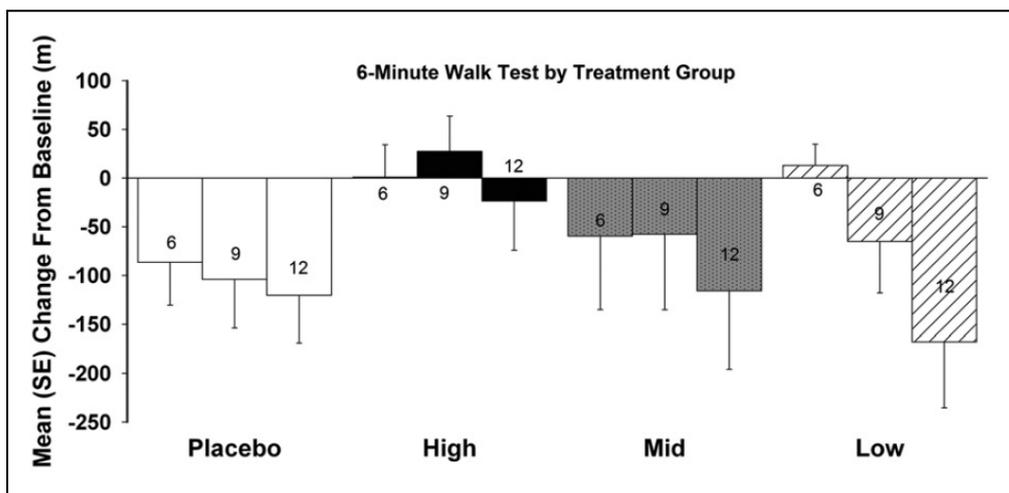


Figura 23 - Alterações no teste de marcha de 6 min (54)

No domínio funcional, a alteração desde a *baseline* até ao mês 6 no grupo de dose alta foi superior à do grupo placebo no teste de marcha de 6 min (-87 ± 164 m para o grupo placebo versus 1 ± 100 m para o grupo de dose alta; $P=0,18$), reunindo assim os critérios de sucesso estabelecidos para este domínio na análise de grupos (54). No grupo de dose baixa os resultados foram também positivos ao contrário dos resultados do grupo de dose média, mas em ambos os casos os resultados são melhores comparativamente ao grupo placebo.

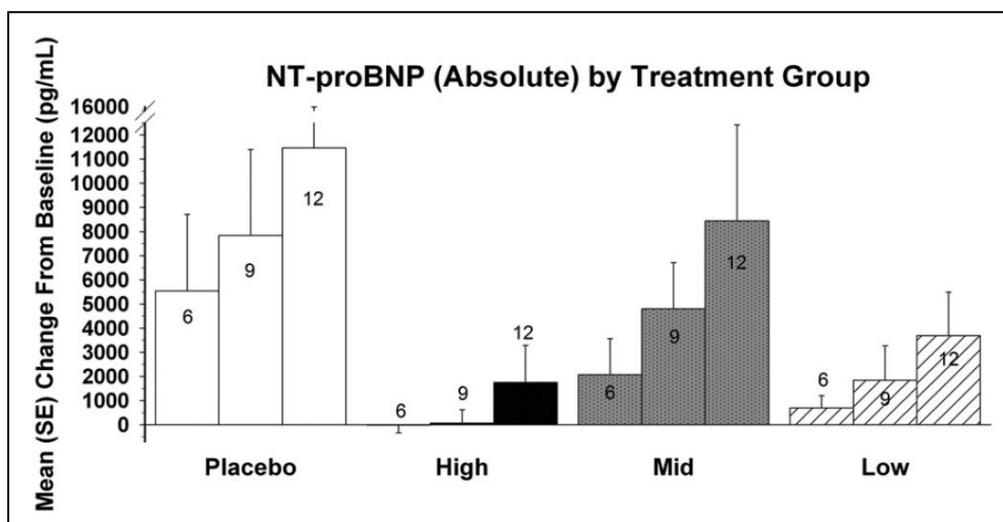


Figura 24 - Alterações no NT-proBNP (54)

Relativamente ao domínio dos biomarcadores, o NT-proBNP aumentou no grupo placebo em 5540 ± 11873 pg/mL. O mesmo se verificou nos restantes grupos mas em menor proporção (54).

No domínio sintomático, a classe NYHA permaneceu praticamente inalterada no grupo placebo ($-0,2 \pm 0,7$) e melhorou nos grupos de tratamento com AAVI/SERCA2a, com um decréscimo médio no grupo de dose alta de $-0,6 \pm 0,7$ (54).

No que diz respeito ao quinto domínio de eficácia, *outcomes* clínicos, a análise do tempo até à ocorrência dos eventos cardiovasculares (morte, dispositivo de assistência ventricular ou transplante cardíaco) foi numericamente favorável ao AAVI/SERCA2a. Foram reportados dois eventos no grupo placebo (morte e dispositivo de assistência ventricular), um evento no grupo de dose média (transplante cardíaco) e nenhum evento nos grupos de dose baixa e alta. Adicionalmente, verificou-se uma redução na duração das hospitalizações por IC no AAVI/SERCA2a versus placebo ($0,2 \pm 0,7$ dias no grupo de dose alta versus $2,1 \pm 2,9$ dias no grupo placebo; $P=0,08$). Deste modo, foram reunidos os critérios de sucesso definidos para este domínio (54).

Na Figura 25 estão representados os principais eventos clínicos (descompensação da IC, EAM, dispositivo de assistência ventricular, administração de agentes inotrópicos, transplante cardíaco e morte) ao longo do estudo.

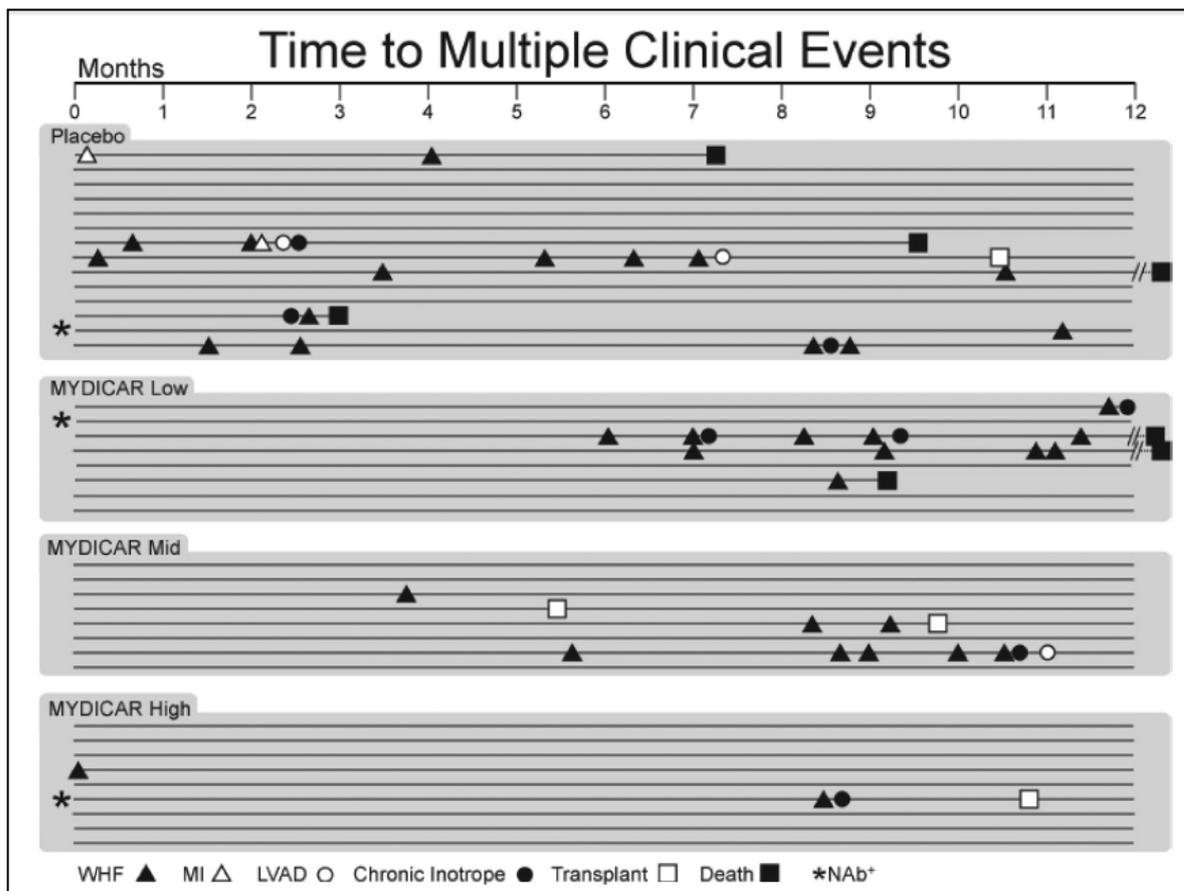


Figura 25 - Eventos cardiovasculares ao longo de 12 meses (54)

A análise da Figura 25 permite retirar três importantes conclusões:

1. Existe um maior número de eventos cardiovasculares no grupo placebo do que nos grupos de tratamento com AAVI/SERCA2a, apesar de não atingir significado estatístico;
2. Os eventos ocorrem mais precocemente no grupo placebo do que nos grupos de tratamento com AAVI/SERCA2a;
3. O número de eventos diminui à medida que aumenta a dose de tratamento com AAVI/SERCA2a.

4.2.9 Discussão

Neste EC fase de 2 foi reportado um sinal clínico de uma possível maior atividade biológica do SERCA2a, medido por vários domínios de eficácia. O grupo de dose alta de AAVI/SERCA2a reuniu os critérios de eficácia estabelecidos quer para a análise individual, quer para a análise de grupos na melhoria dos parâmetros clínicos associados à IC (54).

O impacto do AAVI/SERCA2a na prevenção dos *outcomes* clínicos é talvez o resultado mais importante deste estudo e servirá de base para o *endpoint* primário para a confirmação dos resultados deste EC em futuros estudos (54).

Neste estudo de dimensão reduzida, os sinais positivos concordantes ao longo dos cinco domínios de eficácia suportam a hipótese de que a administração de AAVI/SERCA2a induziu uma atividade biológica significativa. Este estudo veio também confirmar que a via de administração usada no estudo de fase I (infusão intracoronária) é segura e efetiva (54).

A principal limitação deste estudo é o pequeno tamanho da amostra de doentes. Com uma amostra de 39 doentes, há uma limitação no que diz respeito à capacidade de provar de forma conclusiva que os efeitos clínicos observados foram devidos à administração do AAVI/SERCA2a (54). Apesar da forte robustez ao nível dos endpoints de eficácia, serão necessários EC confirmatórios com uma maior amostra de doentes para avaliar adequadamente o potencial desta terapia no tratamento da IC.

De uma forma geral, os resultados deste EC trazem uma nova esperança para o tratamento da IC baseado numa nova estratégia que tem como alvo o SERCA2a e é também um avanço no caminho desta terapia rumo à prática clínica.

4.2.10 Avaliação da Qualidade Metodológica

À semelhança do que foi feito no estudo CUPID fase I, a avaliação da qualidade deste artigo foi feita de acordo com a *guideline* proposta pelo *The centre for reviews and dissemination do National Institute for Health Research* (“Undertaking Systematic Reviews of Research on Effectiveness”).

Os resultados da avaliação da qualidade metodológica do estudo experimental que foi identificado na estratégia de pesquisa estão descritos na Tabela 17.

O estudo CUPID fase 2 tem nota máxima no que diz respeito à qualidade metodológica. Como se trata de um estudo duplamente oculto, os pontos 5, 6 e 7 foram avaliados como adequados ao contrário do que aconteceu no estudo CUPID fase I.

A excelente qualidade metodológica confere ao estudo uma grande visibilidade na comunidade médica e científica e será um grande incentivo para a realização de EC confirmatórios essenciais para validar a atividade biológica do AAVI/SERCA2a bem como a sua relação com os efeitos clínicos observados.

Tabela 17 - Avaliação da qualidade metodológica do estudo CUPID fase 2

Critérios	Avaliação*
<p>1. Was the assignment to the treatment groups really random?</p> <p><i>Adequate approaches to sequence generation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Computer-generated random numbers • Random numbers tables <p><i>Inadequate approaches to sequence generation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Use of alternation, case record numbers, birth dates or week days 	A
<p>2. Was the treatment allocation concealed?</p> <p><i>Adequate approaches to concealment of randomisation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Centralised or pharmacy-controlled randomisation • Serially-numbered identical containers • On-site computer based system with a randomisation sequence that is not readable until allocation • Other approaches with robust methods to prevent foreknowledge of the allocation sequence to clinicians and patients <p><i>Inadequate approaches to concealment of randomisation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Use of alternation, case record numbers, birth dates or week days • Open random numbers lists • Serially numbered envelopes (even sealed opaque envelopes can be subject to manipulation) 	A
3. Were the groups similar at baseline in terms of prognostic factors?	A
4. Were eligibility criteria specified?	A
5. Were outcome assessors blinded to the treatment allocation?	A
6. Was the care provided blinded?	A
7. Was the patient blinded?	A
8. Were the point of estimates and measure of variability presented for the primary outcome measure?	A
9. Did the analyses include an intention to treat analysis?	A
*Avaliação: A - Adequado; PA - Parcialmente adequado; I - Inadequado; D – Desconhecido.	

4.3. Ensaio Clínico 3 – “A Phase 2b, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multinational, Multicenter, Randomized Study Evaluating the Safety and Efficacy of Intracoronary Administration of MYDICAR® (AAVI/SERCA2a) in Subjects With Heart Failure”

Os resultados favoráveis, quer ao nível da eficácia quer ao nível de segurança, do estudo CUPID fase 2 foram a base para a realização de um estudo confirmatório cuja principal característica é o aumento do tamanho da amostra do estudo.

4.3.1 Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar se o AAVI/SERCA2a reduz a frequência e/ou retarda as hospitalizações por IC em doentes com IC em estadio avançado quando adicionado às terapêuticas otimizadas para cada doente (55).

4.3.2 Visão Global

O EC CUPID fase 2b é um estudo randomizado, paralelo, duplamente oculto, controlado com placebo, multinacional e multicêntrico. Este estudo teve início em Agosto de 2012 e tem um fim previsto em Janeiro de 2016, estando a ser realizado nos Estados Unidos da América, Dinamarca, Alemanha, Polónia e Suécia (55).

O recrutamento previsto é de 200 doentes com o objetivo de que amostra tenha significado estatístico para a análise dos resultados e para que seja possível estabelecer a relação dos efeitos clínicos do estudo com o medicamento experimental. O aumento do tamanho da amostra para um número considerável de doentes é o grande ponto forte deste estudo e, por este motivo, este será o EC onde se poderá confirmar a atividade biológica do AAVI/SERCA2a.

Dado que no estudo CUPID fase 2 os melhores resultados ao nível da eficácia e segurança foram registados no grupo de dose alta de AAVI/SERCA2a, este estudo tem apenas dois braços: (55)

- Infusão intracoronária de 1×10^{13} DNase Resistant Particles de AAVI/SERCA2a (esta foi a dose usada no grupo de dose alta do estudo anterior);
- Infusão intracoronária de placebo.

4.3.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os principais critérios de inclusão e exclusão permaneceram inalterados em relação ao estudo de fase 2, com exceção dos dois seguintes critérios de inclusão: (55)

- Indivíduos entre os 18 e os 80 anos de idade;
- Classe NYHA II, III, ou IV.

A alterações destes dois critérios de inclusão entram em concordância com os critérios aplicados nos EC de IC com medicamentos convencionais, de modo a facilitar a comparação entre os resultados dos diferentes estudos a decorrer para o tratamento da IC.

4.3.4 Endpoints Primários e Secundários

O *endpoint* primário deste estudo é o tempo até à ocorrência de hospitalizações por IC durante 12 meses. Este *endpoint* permite, assim, testar a hipótese do estudo de que a administração de AAVI/SERCA2a em associação à terapêutica otimizada para cada doente pode diminuir o número de hospitalizações por IC e/ou atrasar a ocorrência das mesmas (55).

Os *endpoints* secundários são o tempo até à ocorrência de morte por todas as causas, transplante cardíaco e implantação de dispositivos de assistência ventricular (55).

5. Conclusão

Apesar da grande diversidade de tratamentos farmacológicos para a IC, as elevadas taxas de mortalidade e morbidade desta condição bem como a falta de qualidade de vida dos doentes refletem a urgente necessidade do desenvolvimento de uma terapêutica mais eficaz. É neste contexto que surge o desenvolvimento do AAVI/SERCA2a, aliando as características promissoras da terapia génica e o seu direcionamento para um alvo amplamente estudado e validado na IC: a SERCA2a.

Seguindo a lógica da investigação translacional, os resultados pré-clínicos favoráveis permitiram desenvolver protocolos de investigação clínica. Atualmente, a Medicina Baseada na Evidência assume uma crescente importância e, por este motivo, a avaliação dos resultados de ensaios clínicos controlados e randomizados é fundamental dado o elevado nível de evidência dos mesmos.

Os EC desenvolvidos tiveram como principais objetivos determinar a segurança e eficácia do AAVI/SERCA2a. No que diz respeito à segurança, esta foi confirmada pelo baixo número de AEs e pela ausência de SAEs relacionados com o medicamento experimental como consta nos estudos CUPID fase 1/2 e fase 2. Relativamente à eficácia, apesar dos resultados claramente favoráveis em vários parâmetros de eficácia do grupo de dose mais alta de AAVI/SERCA2a em comparação com o grupo placebo, o reduzido número de doentes nestes dois estudos iniciais não permite obter resultados de eficácia com significado estatístico. Por este motivo, está atualmente a decorrer um EC confirmatório com uma amostra prevista de 200 doentes para responder à questão em aberto pelos dois primeiros estudos: o tratamento com AAVI/SERCA2a é eficaz numa grande população de doentes com IC?

Os pontos fortes dos EC com AAVI/SERCA2a passam pela robustez dos *endpoints* de eficácia uma vez que se tratam de *endpoints* compósitos nos quais as melhorias significativas estão bem estabelecidas, reduzindo a taxa de falsos positivos, e pela elevada qualidade metodológica.

Apesar da eficácia do medicamento experimental necessitar de ser verificada num estudo confirmatório, se os resultados iniciais promissores se mantiverem, a IC poderá ser a primeira condição cardiovascular a ter um tratamento de terapia génica na prática clínica. Deste modo, à semelhança do que aconteceu nos participantes dos primeiros EC, uma grande percentagem dos doentes com IC poderá beneficiar de um tratamento inovador, reduzindo, assim, as taxas de mortalidade e morbidade desta condição e melhorando

significativamente a qualidade de vida destes doentes, o que permite também reduzir os custos de saúde diretos e indiretos associados à IC.

Referências Bibliográficas

1. **MCMURRAY, John, et al.** ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *ESC Guidelines*. 2012. Vol. 33, pp. 1787-1847.
2. **KOSSMANN, Charles.** *Diseases of the Heart and Blood Vessels: Nomenclature and Criteria for Diagnosis*. Boston : Little Brown, 1964.
3. **CUBERO, Javier Segovia, et al.** Heart Failure: Etiology and Approach to Diagnosis. *Revista Española de Cardiología*. 2004, Vol. 57, pp. 86-95.
4. **SA, HUNT, et al.** ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult. *Journal of American College of Cardiology*. 2001, Vol. 38, pp. 2101-2103.
5. **KATZ, AM.** *Heart Failure: Pathophysiology, Molecular Biology and Clinical Management*. Philadelphia : Lippincott Williams & Williams, 2000.
6. **MCPHEE, Stephen J e GANONG, William.** *Fisiopatologia da Doença: Uma Introdução à Medicina Clínica*. São Paulo : Mcgraw-hill Interamericana, 2007. p. 232.
7. **CAMBÃO, Mariana Seixas e MOREIRA, Adelino F. Leite.** Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca Crónica. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2009, Vol. 28, pp. 439-471.
8. **PINTO, Anabela Mota.** *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações*. Coimbra : Lidel, 2007. pp. 382-386.
9. **LONGO, Dan, et al.** *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18. New York : The McGraw-Hill, 2012.
10. **CEIA, Fátima, et al.** Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *The European Journal of Heart Failure*. 2002, Vol. 4, pp. 531-539.
11. **European Medicines Agency - Committee for Advanced Therapies.** Reflection Paper on Classification of Advanced Therapy. Londres : s.n., 2012.
12. **Assembleia da República.** Lei N.º12/2005. *Informação genética pessoal e informação de saúde*. 2005.
13. **LY, Hung, et al.** Gene Therapy in the Treatment of Heart Failure. *Physiology*. 2007, Vol. 22, pp. 81-96.
14. **TILEMANN, L., et al.** Gene Therapy for Heart Failure. *Circulation Research*. 2012, Vol. 110, pp. 777-793.
15. **ZOUEIN, F. e BOOZ, G.** AAV-mediated Gene Therapy for Heart Failure: Enhancing Contractility and Calcium Handling. *F1000Prime Reports*. 2013, Vol. 10, pp. 5-27.
16. **NAIM, Charbel, YEREVANIAN, Armen e HAJJAR, Roger.** Gene Therapy for Heart Failure: Where Do We Stand? *Current Cardiology Reports*. 2013, Vol. 15, pp. 315-333.
17. **DISHART, Kate L., et al.** Gene Therapy for Cardiovascular Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2003, Vol. 2, pp. 138-148.

18. **VETRINI, F. e NG, P.** Gene Therapy with Helper-dependent Adenoviral Vectors: Current Advances and Future Perspectives. *Viruses*. 2010, Vol. 9, pp. 1186-1917.
19. Adenoviral Vectors. *Gene Therapy Net*. [Acedido a 25 de Abril de 2013.] Disponível na Internet: <http://www.genetherapynet.com/viral-vectors/adenoviruses.html>.
20. **RAPER, S., et al.** Fatal Systemic Inflammatory Response Syndrome in a Ornithine Transcarbamylase Deficient Patient Following Adenoviral Gene Transfer. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2003, Vol. 80, pp. 148-158.
21. **ASOKAN, A., SCHAFFER, D. e SAMULSKI, R.** The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Molecular Therapy*. 2012, Vol. 20, pp. 699-708.
22. **LI, C., et al.** Neutralizing Antibodies Against Adeno-associated Virus Examined Prospectively in Pediatric Patients with Hemophilia. *Gene Therapy*. 2012, Vol. 19, pp. 288-294.
23. Adeno-Associated Viral Vectors. *Gene Therapy Net*. [Acedido a 25 de Abril de 2013.] Disponível na Internet: <http://www.genetherapynet.com/viral-vectors/adeno-associated-viruses.html>.
24. **CALCEDO, R., et al.** Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-associated Viruses. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009, Vol. 199, pp. 381-380.
25. **BONCI, D., et al.** Advanced Generation Lentiviruses as Efficient Vectors for Cardiomyocyte Gene Transduction in Vitro and in Vivo. *Gene Therapy*. 2003, Vol. 10, pp. 630-636.
26. Retroviral Vectors. *Gene Therapy Net*. [Acedido a 25 de Abril de 2013.] Disponível na Internet: <http://www.genetherapynet.com/viral-vectors/retroviruses.html>.
27. **VAN DER LOO, J., et al.** Critical Variables Affecting Clinical-grade Production of the Self-inactivating Gamma-retroviral Vector for the Treatment of X-linked Severe Combined Immunodeficiency. *Gene Therapy*. 2012, Vol. 19, pp. 872-876.
28. Lentiviral Vectors. *Gene Therapy Net*. [Acedido a 25 de Abril de 2013.] Disponível na Internet: <http://www.genetherapynet.com/viral-vectors/lentiviruses.html>.
29. **YANO, Ikeda M. e MATSUZAKI, M.** Altered Intracellular Ca²⁺ Handling in Heart Failure. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, Vol. 115, pp. 556-564.
30. **GIANNI, Davide, et al.** SERCA2a in Heart Failure: Role and Therapeutic Prospects. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2005, Vol. 6.
31. **PARK, W. e OH, J.** SERCA2a: a Prime Target for Modulation of Cardiac Contractility During Heart Failure. *BMB Reports*. 2013, Vol. 46, pp. 237-243.
32. **BERS, D. M.** Cardiac Na⁺/Ca²⁺ Exchange Function in Rabbit, Mouse and Man: What's the Difference? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2002, Vol. 34, pp. 369-373.
33. **SHANNON, T. R. e BERS, D. M.** Integrated Ca²⁺ Management in Cardiac Myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004, Vol. 1015, pp. 28-38.
34. **MARTONOSI, A. N. e PIKULA, S.** The Structure of the Ca²⁺-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. *Acta Biochimica Polonica*. 2003, Vol. 50, pp. 337-365.

35. **ODERMATT, A., et al.** Mutations in the Gene-encoding SERCA1, the Fast-twitch Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase, are Associated with Brody Disease. *Nature Genetics*. 1996, Vol. 14, pp. 191-194.
36. **OTSU, K., et al.** Chromosome Mapping of Five Human Cardiac and Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Protein Genes. *Genomics*. 1993, Vol. 17, pp. 507-509.
37. **BOBE, R., et al.** Identification, Expression, Function and Localization of a Novel (Sixth) Isoform of the Human Sarco/endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase 3 (SERCA3) Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, Vol. 379, pp. 24297-24306.
38. **DODE, L., et al.** Molecular Characterization of a Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Gene from Paramecium Tetraurelia and Localization of its Gene Product to Sub-plasmalemmal Calcium Stores. *Biochemical Journal*. 1996, Vol. 318, pp. 689-699.
39. **TOYOSHIMA, C., et al.** Crystal Structure of the Calcium Pump of Sarcoplasmic Reticulum at 2.6 Å Resolution. *Nature*. 2000, Vol. 405, pp. 647-655.
40. **TOYOSHIMA, C., SASABE, H. e STOKES, D. L.** Structure of the Ca²⁺ Pump of Sarcoplasmic Reticulum: a View along the Lipid Bilayer at 9-Å Resolution. *Nature*. 1993, Vol. 362, pp. 467-371.
41. **ASAHI, M., et al.** Cardiac-specific overexpression of Sarcolipin inhibits Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) Activity and Impairs Cardiac Function in Mice. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003, Vol. 13, pp. 152-157.
42. **CHEN, Z., STOKES, D. L. e JONES, R. L.** Role of Leucine 31 of Phospholamban in Structural and Functional Interactions with the Ca²⁺ Pump of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, Vol. 280, pp. 10530-10539.
43. **KOSS, K. L. e KRANIAS, E. G.** Phospholamban: A Prominent Regulator of Myocardial Contractility. *Circulation Research*. 1996, Vol. 79, pp. 1059-1063.
44. **PATHAK, A., et al.** Enhancement of Cardiac Function and Suppression of Heart Failure Progression by Inhibition of Protein Phosphatase I. *Circulation Research*. 2005, Vol. 96, pp. 756-766.
45. **DEL MONTE, F. D. e HAJJAR, R. J.** Targeting Calcium Cycling Proteins in Heart Failure through Gene Transfer. *The Journal of Physiology*. 2003, Vol. 546, pp. 49-61.
46. **HAJJAR, R. J., et al.** Physiological Effects of Adenoviral Gene Transfer of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase in isolated Rat Myocytes. *Circulation Research*. 1997, Vol. 95, pp. 423-429.
47. **DEL MONTE, F., et al.** Restoration of Contractile Function in isolated Cardiomyocytes from Failing Human Hearts by Gene Transfer of SERCA2a. *Circulation Research*. 1999, Vol. 100, pp. 2308-2311.
48. **MIYAMOTO, M. I., et al.** Adenoviral Gene Transfer of SERCA2a improves Left-ventricular Function in Aortic-banded Rats in Transition to Heart Failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, Vol. 97, pp. 793-798.
49. **LIU, W., et al.** Developmental Changes of Ca²⁺ Handling in Mouse Ventricular Cells from early Embryo to Adulthood. *Life Sciences*. 2002, Vol. 71, pp. 1279-1292.

50. **DEL MONTE, F., et al.** Targeting Phospholamban in Human Heart Failure by Gene Transfer. *Circulation Research*. 2002b, Vol. 105, pp. 904-907.
51. **DEL MONTE, F., et al.** Protein Aggregates and Novel Presenilin Gene Variants in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*. 2002a, Vol. 8, pp. 421-431.
52. **HAJJAR, R. G., et al.** Design of a Phase I/2 Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2008, Vol. 14, pp. 355-367.
53. **JASKI, B. E., et al.** 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*. 2009, Vol. 15, pp. 171-182.
54. **JESSUP, M., et al.** Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) : A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Patients With Advanced Heart Failure. *Circulation Research*. 2011, Vol. 124, pp. 304-313.
55. **U.S. National Institutes of Health.** A Study of Genetically Targeted Enzyme Replacement Therapy for Advanced Heart Failure (CUPID-2b). *Clinicaltrials.gov*. [Acedido a 7 de Junho de 2013.] Disponível na Internet: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01643330?term=cupid&rank=4>.
56. **ZHAI, J., et al.** Cardiac-specific overexpression of a Superinhibitory Pentameric Phospholamban Mutant enhances Inhibition of Cardiac Function in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 2000, pp. 10538-10544.
57. **The Journal of Gene Medicine.** Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Wiley. [Acedido a 27 de Abril de 2012.] Disponível na Internet: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
58. **GELEBART, P., et al.** Identification of a New SERCA2 Splice Variant Regulated During Monocytic Differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, Vol. 303, pp. 676-684.
59. **KAPRIELIAN, R., DEL MONTE, F. e HAJJAR, R. J.** Targeting Ca²⁺ Cycling Proteins and the Action Potential in Heart Failure by Gene Transfer. *Basic Research in Cardiology*. 2002, Vol. 97, pp. 136-145.
60. **LI, J., et al.** Construction of Phospholamban Antisense RNA Recombinant Adeno-associated Virus Vector and its effects in Rat Cardiomyocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005, Vol. 26, pp. 51-55.
61. **U.S. National Institutes of Health.** AC6 Gene Transfer for CHF. *Clinicaltrials.gov*. [Acedido a 27 de Agosto de 2013.] Disponível na Internet: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00787059>.