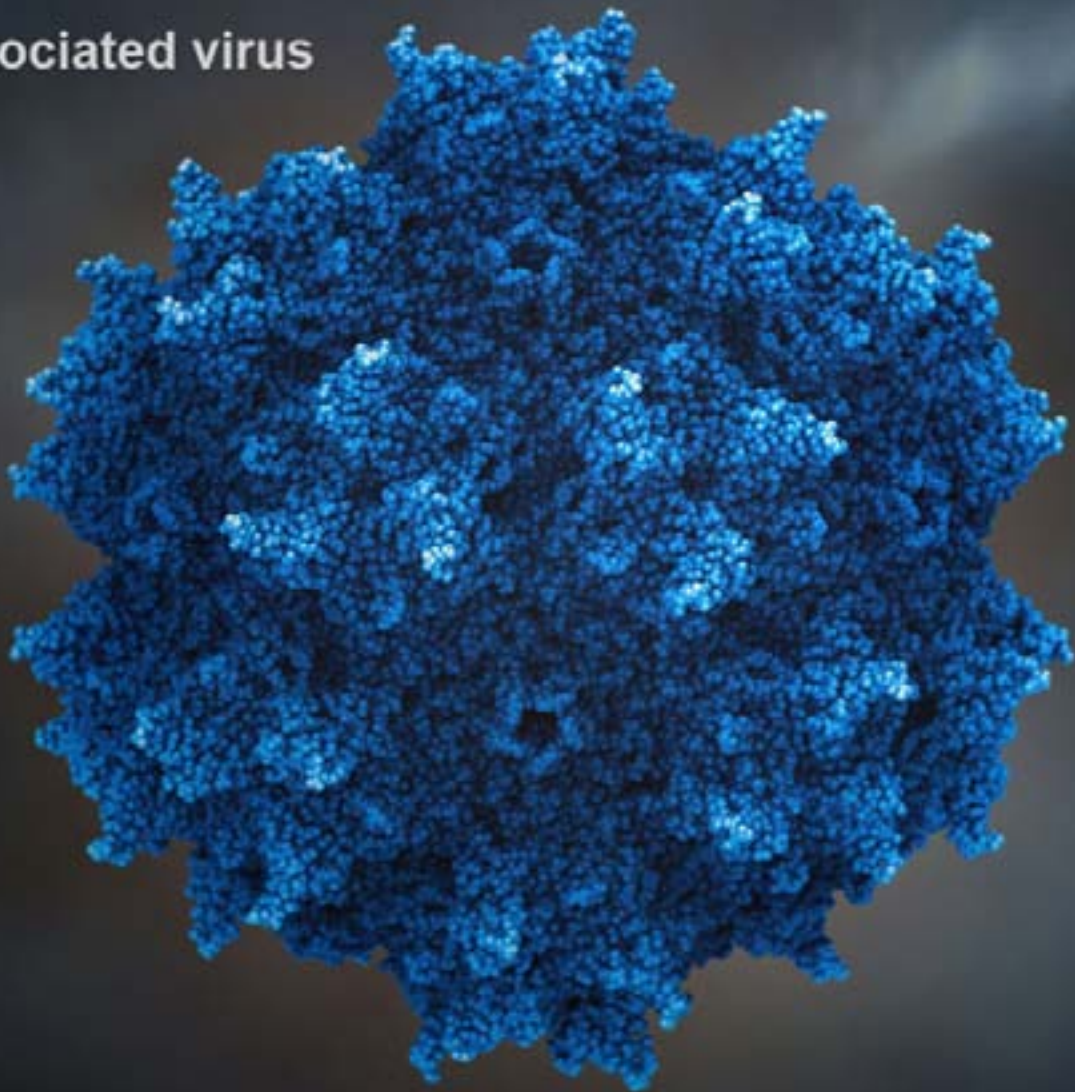


Adeno-Associated virus
PDB: 1lp3



Pedro dos Santos Rodrigues

Adeno Associated Viral Vectors for Brain Gene Therapy

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Pedro dos Santos Rodrigues

Adeno Associated Viral Vectors for Brain Gene Therapy

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Pedro dos Santos Rodrigues, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010136740, declaro assumir toda a responsabilidade do conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da Unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 11 de setembro de 2015.

Assinatura

(Pedro dos Santos Rodrigues)

O Tutor da Monografia

(Professor Doutor Luís Pereira de Almeida)

Coimbra, 11 de setembro de 2015

O Estudante

(Pedro dos Santos Rodrigues)

Agradecimentos

Gostaria de aproveitar esta oportunidade para agradecer todo o apoio recebido durante a realização Monografia.

Ao Professor Doutor Luís Almeida pela paciência que demonstrou neste período.

À minha Família, especialmente aos meus Pais e ao meu Irmão.

À Inês pelo infindável apoio que tem dado durante toda a duração do curso.

Gostaria de terminar com um agradecimento a todos os colegas com quem partilhei as salas, os laboratórios e também Coimbra, bem como aos Professores que me abriram os horizontes para a nossa Profissão.

Resumo

Desde que foram isolados como contaminantes de uma cultura de Adenovírus, os vírus adenoassociados têm sido alvo de investigação e é já conhecida a grande maioria dos seus processos moleculares, o que permitiu defini-lo como um bom candidato a vetor para transferência de genes. O uso dos vírus como vetores de terapia genética prende-se ao facto de ser possível aproveitar a sua capacidade inata de invadir uma célula e transportar o conteúdo genético, podendo servir para a entrega localizada de genes.

Muitas das doenças cerebrais têm como origem um problema genético ou o seu desenvolvimento está relacionado com a disfunção numa via molecular específica, constituindo assim alvos naturais para a terapia genética.

Avaliando-se a melhor via de administração e desenvolvendo modelos pré-clínicos mais realistas irá facilitar a obtenção de resultados positivos em ensaios clínicos, culminando com a posterior comercialização do produto.

Palavras-Chave: AAV, vetor viral, SNC, Vias de administração, modelo Pré-Clínico, Ensaios Clínicos.

Abstract

Since they were discovered as a contaminant of an Adenovirus culture, AAV have been studied, and they were suitable to use a viral vector because of current understanding of their molecular mechanisms. The use of viruses as gene therapy vectors is due to their natural ability to infect cells and expose their genetic content, which can be used for targeted gene delivery.

Many brain diseases are due to a genetic disorder or its development is related with a protein dysfunction, making them a valid target to genetic therapy.

Evaluating the best delivery route and developing accurate preclinical models will facilitate clinical trials results, leading to a faster market approach.

Keywords: AAV, viral vector, NCS, delivery routes, preclinical model, Clinical Trials

Abreviaturas

AAP – *Assembly-Activating Protein*

AAV – *Adeno Associated Virus*

BHE – *Barreira Hematoencefálica*

DNA – *DesoxyriboNucleic Acid*

FGFR – *Human Fibroblast Growth Factor Receptor*

ITR – *Inverted Terminal Repeats*

ORF – *Open Reading Frames*

HSPG – *Heparan Sulphate Proteoglycan*

LCR – *Líquido Cefalo-raquídeo*

RBE – *Rep Binding Element*

SNC – *Sistema Nervoso Central*

TRS – *Terminal Resolution Site*

VP – *Viral Protein*

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
Índice	4
1. Introdução	6
2. Virus adeno-associados	8
2.1 Replicação	9
2.2 Internalização e Tráfego Intracelular	10
2.3 Recombinação	11
3. Vias de administração	12
3.1 Local	12
3.2 Administração no Líquido Cefalorraquidiano (LCR):	12
3.3 Administração por Via Intranasal	13
3.4 Administração por via Intravenosa	14
4. Resultados promissores	16
4.1 Utilização de AAVs para desenvolvimento de Modelos Pré-Clínicos	16
4.2 Ensaio Clínicos	17
5. Assuntos Regulamentares	18
5.1 Ensaio exigidos para Medicamentos de Terapia Avançada	19
5.2 Estudos suplementares	20
5.3 Uso de auxiliares da ação do Medicamento de Terapia Avançada	20
5.4 Características sobre os vetores	20
5.5 Pós-autorização	21
6. Patentes e Empresas	22
7. Conclusão	23

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 – Mapa do genoma do AAV-2 wild-type (Daya & Berns, 2008)	9
Figura 2 – Mecanismo de deslocamento de cadeia (Gonçalves, 2005)	10
Figura 3 – Tráfego Intracelular do AAV (Balakrishnan & Jayandharan, 2014)	10
Figura 4 – Produção de rAAV e consequente integração no genoma (Ke et al., 2011).....	11
Tabela 1– Doenças alvo de Ensaios Clínicos tendo por base um vetor AAV.....	17

I. Introdução

Desde a Antiguidade que o Homem, enquanto espécie, tentou descobrir o que podia fazer para melhorar o seu estado de saúde quando abalado por enfermidades. Para tal recorria a tentativas para perceber que produtos (essencialmente plantas) tinham propriedades para a cura ou tratamento de determinada sintomatologia.

Com o avançar dos tempos, acompanhado por um maior conhecimento do que o rodeia, surgem novos fenómenos que carecem de explicação e, para alimentar esta espiral, estes devem ser elucidados. Um dos acontecimentos que se enquadram na descrição foi o facto de algumas substâncias não terem a capacidade, quando administradas sistemicamente, de exercerem ação a nível do sistema nervoso central (SNC).

Uma tentativa de explicar esta observação surge ainda no século XIX, quando se observou que após administração sistémica de um corante hidrossolúvel todos os órgãos à exceção do cérebro e da espinal medula se encontravam corados (Ehrlich, 1885), ação essa que foi posteriormente atribuída, pelo mesmo autor, à baixa afinidade que o tecido nervoso tinha para aquele tipo de compostos (Ehrlich, 1904). Alguns anos mais tarde, um aluno deste autor comprovou que tal não se verificava, já que administrando Azul de Trypan (substância hidrossolúvel) a nível do líquido cefalo-raquídeo (LCR), esta era distribuída por todo o tecido nervoso, não sendo observado, no entanto, qualquer pigmento na periferia (Goldman, 1904). As duas situações descritas davam a entender a existência de uma barreira física entre o SNC e a circulação – originalmente denominada *Bluthirnschranke* (Lewandowsky, 1900)- Barreira Hemato Encefálica.

A aceitação da existência da BHE não foi pacífica, com uma equipa a postular que a aparente BHE se devia ao facto de se assumir que o espaço extracelular era considerável quando na realidade era praticamente não existente (Maynard *et al.*, 1957). Apenas em meados do século XX, se formulou uma teoria a contrariar a anterior: o estudo consistiu na postulação de que se realmente o espaço extracelular era praticamente inexistente e que a distribuição de algumas substâncias no cérebro se devia à sua penetração lenta no parênquima cerebral, esta continuaria a ser semelhante se fossem administradas as mesmas substâncias dissolvidas em solução de Ringer a tecido cerebral excisado. Tal não aconteceu e, ao compararem a distribuição da solução em tecido muscular excisado (conhecido por ter um espaço extracelular considerável) as taxas de distribuição eram semelhantes. Isso não acontecia se a administração da solução fosse periférica e se se medisse a distribuição nos mesmos órgãos (praticamente inexistente para o cérebro e rápida para o tecido muscular) (Davson & Spaziani, 1959).

Este foi sem dúvida um marco importante porque se começaram a delinear estratégias para gerar compostos que exercessem a sua ação no SNC.

A primeira aplicação prática de uma proteína recombinante surge com a insulina (Goeddel *et al.*, 1979). Depois disso, pensou-se em mecanismos que permitissem que as células humanas produzissem a proteína de interesse, em vez de estas serem produzidas por células de outras espécies. Assim, em 1990, a terapia génica ‘nasce’ com o trabalho de William French Anderson (PHGU, 2002), mostrando ser possível manipular o genoma de uma cultura de células (linfócitos) e depois administrá-las para que exerçam a sua função no organismo.

O pensamento seguinte foi tentar adaptar a ideia à administração de algo que se direcionasse, *in vivo*, para as células de interessa e que, à semelhança do que Anderson postulou *ex vivo*, integrassem um determinado gene e passassem a expressar a proteína correspondente. Uma das condicionantes cruciais para se conseguir modificar o genoma das células é a obtenção de um vetor adequado para transportar os ácidos nucleicos às células alvo e promover a sua incorporação no local certo do genoma da célula alvo.

Depois da sua descoberta como contaminante de uma cultura de adenovírus (Atchison *et al.*, 1965), surgiram os primeiros testes com a possível aplicação dos AAV em clonagem de genes em células de mamíferos (Hermonat & Muzyczka, 1984). Um ponto alto da implementação desta tecnologia surge em 2012 quando a Comissão Europeia concede a autorização para a comercialização do primeiro medicamento que tem por base um vetor AAV, para restaurar a atividade da enzima Lipoproteinalipase (necessária para o processamento de proteínas transportadoras de lípidos após a refeição- quilomicrons) (UniQure, 2012).

2. Virus adeno-associados

Os vírus adeno-associados (AAV) são uma espécie de vírus que fazem parte do género *Dependovirus*, pertencentes à família *Parvoviridae* e que não foram, até hoje, relacionados com nenhuma doença no hospedeiro (Tenenbaum *et al.*, 2003).

Os vírus AAV do serotipo 2 (os mais estudados) são vírus sem envelope de pequenas dimensões -25nm- que têm incorporado um genoma de DNA de cadeia simples e linear (ssDNA) com cerca de 4.7Kb. A cápside viral é composta por 60 subunidades, tendo forma icosaédrica (Srivastava *et al.*, 1983).

Para que se possam replicar nas células do hospedeiro, tem que existir coinfeção por outro tipo de vírus de DNA (nomeadamente Adenovírus e vírus da família do Herpes Simplex), o que leva também à sua expressão e conseqüente formação de novos viriões (Atchison *et al.*, 1965). Para tal não ser determinante na viabilidade da espécie adotaram, do ponto de vista evolucionário, dois mecanismos para precaverem esta situação: tornaram-se capazes de infetar variados tecidos, o que pode aumentar a frequência da coinfeção, e tornaram-se capazes de integrar o genoma do hospedeiro quer a nível cromossomal (cromossoma 19) (R M Kotin, 1990), quer a nível episomal.

Se a primeira é uma estratégia de latência eficaz, visto que a informação genética fica armazenada até a coinfeção do vírus *helper* ocorrer, a segunda já não tem essa salvaguarda; no entanto, esse só é um problema relevante para a expressão a longo prazo em células em divisão, já que em células quiescentes (como as nervosas) tal não se coloca apresentando ainda a vantagem de prevenir o risco de carcinogénese por inserção mutacional (Kerr *et al.*, 2005).

Como se pode observar na **Figura I-A**, o genoma é caracterizado por possuir duas ITR's (compostas por 145 bases) que flanqueiam dois genes, *rep* e *cap*, em zonas codificantes (ORF). Os ITR's são seqüências importantes devido a propriedades *cis*-ativas (são zonas de DNA que não codificam aminoácidos mas que têm a capacidade de ativar genes próximos) e as ORF's contêm o *Rep* e o *Cap*. A ORF esquerda contém o *Rep*, que codifica quatro proteínas de replicação (Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40), enquanto que a direita contém o *Cap*, que codifica as proteínas da cápside (VP1, VP2 e VP3) (Atchison *et al.*, 1965).

Também ilustrado na **Figura I-A**, as proteínas produzidas dependem do promotor usado: se a transcrição usar o promotor p5 formam-se as proteínas maiores, Rep 78 e Rep 68; já as proteínas de menores dimensões, Rep52 e Rep40, são produzidas se for usado o

promotor PI9. Outra diferença entre a obtenção das diferentes Rep é o tipo de transcrição: o transcrito que dá origem à Rep78 e Rep52 não sofre *splicing* enquanto que o que dá origem à Rep68 e à Rep40 sofre (Daya & Berns, 2008).

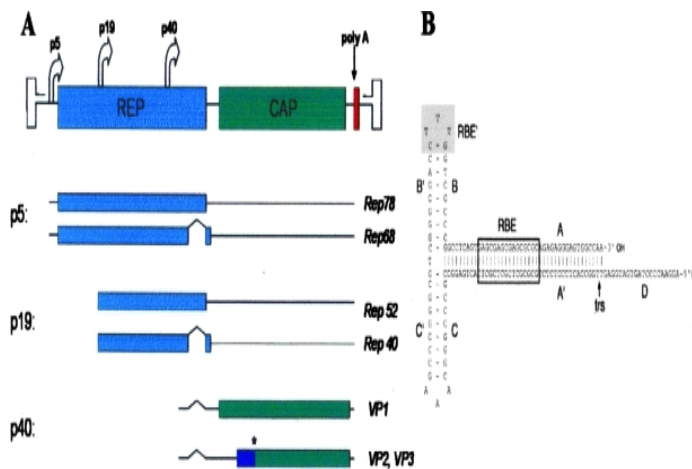


Figura 1 – Mapa do genoma do AAV-2 wild-type (Daya & Berns, 2008).

A- Mapa do genoma com a indicação da localização dos ITR's, do Rep e Cap, bem como a localização dos promotores de transcrição e proteínas expressadas consoante promotor utilizado.

B- Localização das RBE e da TRS.

Já quanto à função das proteínas, as de maior tamanho são importantes por atuarem em *trans*, regulando o processo de replicação e de expressão de genes (se houver coinfeção) enquanto as de menores dimensões são responsáveis por acumularem o ssDNA para encapsidação. (Pereira *et al.*, 1997).

Para a expressão das VP's a transcrição do Cap utiliza o promotor P40, dando origem posteriormente a um transcrito que sofreu *splicing*, dando origem à VP1, e um transcrito que sofre *splicing*. O codão de iniciação usado para a tradução vai determinar a produção das proteínas VP2 e VP3: para se formar a VP2, o codão de iniciação usado é o ACG (pouco comum), enquanto para se formar a VP3 o codão de iniciação usado é o AUG (mais comum), sendo esta a proteína expressa em maior quantidade (Naumer *et al.*, 2012).

Foi descoberta também uma porção que codifica um fator essencial na estruturação da cápside viral, o AAP, codificada noutro ORF do Cap, sendo a sua tradução iniciada pelo codão CUG (Sonntag *et al.*, 2010).

2.1 Replicação

Na replicação do DNA (**Figura 2**), os ITR's funcionam como local de origem da replicação e servem de *primer* para a cadeia de DNA complementar formada pela *DNA polimerase* da célula. Essa dupla cadeia de DNA denomina-se monómero *replicating-form* e é usada para uma segunda ronda de autorreplicação (usando as suas bases como *primers*), formando um dímero *replicating-form*. Ambos são processados por um mecanismo de deslocação de cadeia, resultando o ssDNA para encapsidar e para a transcrição (Daya & Berns, 2008).

Outros componentes críticos para o processo de replicação são os elementos de ligação à proteína Rep - RBE's (RBE e RBE') e um local de corte específico - TRS (**Figura 1-B**). Estes componentes são usados pelas Rep durante a replicação do vírus- processam os intermediários de dupla cadeia.

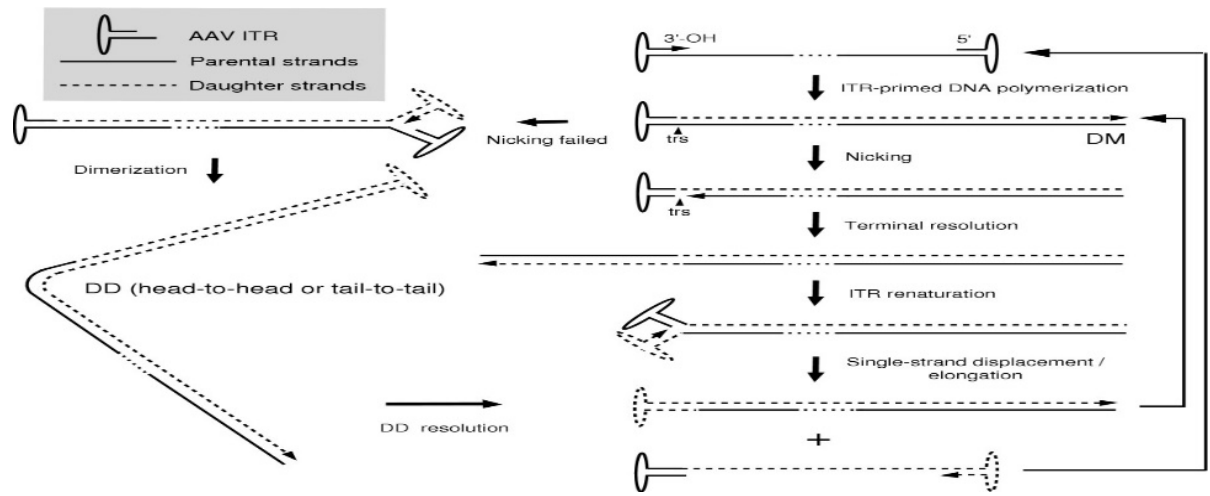


Figura 2 – Mecanismo de deslocamento de cadeia (Gonçalves, 2005).

2.2 Internalização e Tráfego Intracelular

A ligação do AAV nas células ocorre, no caso do AAV-2, através da ligação das proteínas da cápside aos recetores HSPG, presentes na membrana citoplasmática sendo posteriormente internalizado por ação de cofatores deste recetor (integrina $\alpha V\beta 5$ e o FGFR-1), levando à incorporação do vírus em vesículas revestidas por claritrina (Nonnenmacher & Weber, 2012) , como ilustrado na **Figura 3**.

A libertação do vírus dos endossomas é efetuada pela diminuição do pH endossomal, havendo uma alteração da conformação tridimensional das proteínas da cápside. Isto leva a que os domínios proteicos que são responsáveis pela ligação ao NPC, seguindo-se o transporte para o núcleo (Sonntag *et al.*, 2006). No núcleo, pela ação proteolítica de catepsinas observa-se a descapsidação (Akache *et al.*, 2007).

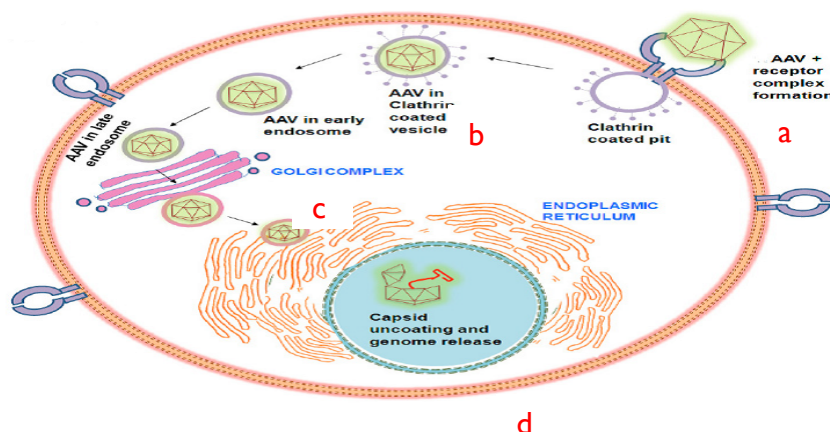


Figura 3 – Tráfego Intracelular do AAV (Balakrishnan & Jayandharan, 2014).

Ligação do AAV ao receptor (a), formando as vesículas revestidos por claritrina (b), deslocação para o espaço perinuclear (c) e translocação para o núcleo com posterior descapsidação (d).

2.3 Recombinação

O genoma do AAV além de apenas ter 4.7 kb contém, como descrito anteriormente, ITR's com capacidade de ativar em *cis* os genes vizinhos. Conciliando estes aspetos, podemos facilmente perceber que o aproveitamento do vetor será maior se se retirarem as sequências de ácidos nucleicos referentes aos *Rep* e *Cap*, visto que as proteínas *Rep* regulam a replicação em *trans*. Para tal ser exequível tem que, numa linha celular correta, se adicionar um plasmídeo com estes genes (são fundamentais para a replicação e encapsulamento) de modo a serem obtidos viriões viáveis para serem usados como vetores. Além disso, e por se tratar de um *Dependovirus*, há também a necessidade de se desenhar um plasmídeo com os genes das proteínas auxiliares dos vírus *helper* (E1A, E1B, E4, E2A e VA, (Ni et al., 1998)). Este processo está esquematizado na **Figura 4**.

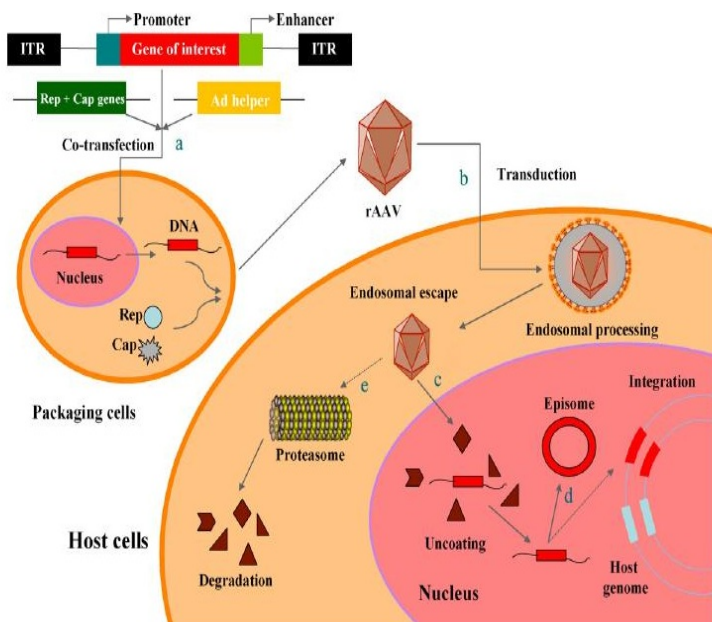


Figura 4 – Produção de rAAV e consequente integração no genoma (Ke et al., 2011).

Esquema de uma co-tranfecção (a) de uma célula com AAV com o genoma alterado para incorporar o gene de interesse, flanqueado pelas ITR's, um plasmídeo com os genes *Rep* e *Cap* e outro com os genes das proteínas *helper* para formação d AAV recombinante, que depois é internalizado na célula (b) e direcionando o genoma ao núcleo (c) onde ocorre a integração no genoma da célula. A cápside é degradada num proteossoma(e)

3. Vias de administração

Como foi explicado anteriormente, o direcionamento de moléculas para o cérebro é complexo muito devido à existência da BHE. Neste trabalho descrevem-se as principais estratégias de administração dos vetores AVV até à região de interesse no Sistema Nervoso Central.

3.1 Local

O método mais simples de administração de fármacos no SNC é o método de administração local ou *in situ* das substâncias, sendo um processo relativamente simples: conhecidos o(s) local(is) anatômico(s) que são afetados pela patologia procede-se à administração do fármaco ou vetor nesse local. Na prática clínica é um método facilmente identificável como invasivo no caso do sistema nervoso central e, além disso, exige meios humanos e técnicos substanciais para a realização da cirurgia. No entanto tem a vantagem de ser preciso, circunscrever a terapia a região a tratar e ser eficaz.

A epilepsia é uma das doenças candidatas a serem tratadas por terapia génica. Trata-se de um conjunto de doenças caracterizadas pela alteração do padrão da atividade neuronal podendo levar a convulsões, espasmos musculares e perda de consciência (NINDS, 2015a). A aplicabilidade da terapia génica com o vetor AAV a epilepsias focais (com origem em determinada parte do cérebro) foi testada por administração, no rato, a nível do hipotálamo de um vetor rAAV pseudotipado com o serotipo I (cápside do serotipo I) que codificava o Neuropeptídeo Y (NPY). O NPY liga-se a recetores pré-sinápticos (NY2), reduzindo a libertação de D-Glutamato nos terminais glutamatérgicos (Colmers *et al.*, 1987), tornando-o um neuropeptídeo com propriedades anticonvulsiantes. Observou-se uma diminuição tanto na frequência como na duração das convulsões, assim como a não verificação de alterações na aprendizagem, memória, ansiedade ou locomoção, o que pode levar a novos desenvolvimentos na área (Noe *et al.*, 2010).

3.2 Administração no Líquido Cefalorraquidiano (LCR):

Intracerebroventricular

Via de administração de substâncias no interior das cavidades (ventrículos) do cérebro, onde circula o LCR.

Intratecal

É uma via de administração de substâncias no canal vertebral (canal formado pela sobreposição das vértebras e que contém a espinal medula), mais precisamente no espaço subaracnoide -entre a pia-máter (membrana mais profunda das meninges) e a membrana aracnoide. Neste espaço circula o LCR (Freitas e Costa, 2014).

A esclerose tuberosa é uma doença candidata a terapia gênica por esta via. Trata-se de uma doença autossômica dominante, causada por mutações nos genes (*TSC1* e *TSC2*) de proteínas (hamartina e tuberina, respetivamente) críticas para a regulação de uma cinase (mTOR) que controla o crescimento e desenvolvimento de muitos tecidos (Laplante & Sabatini, 2012). A doença pode levar a manifestações neurológicas como epilepsia, comprometimento cognitivo ou sintomas semelhantes a autismo (Curatolo & Maria, 2013). Testou-se (Prabhakar *et al.*, 2015) a administração única de um vetor rAAV que codificava o gene *TSC1*, a nível dos ventrículos cerebrais, com o objetivo de comparar os seus efeitos com um estudo que utilizou inibidores da mTOR como tratamento para a esclerose tuberosa (Meikle *et al.*, 2008). Os resultados mostraram que embora a melhoria apresentada (sobrevivência média e normalização do comportamento e peso corporal) pelos murganhos seja semelhante à apresentada aquando do tratamento com os inibidores da mTOR, os efeitos após cessão do tratamento são muito diferentes: com a cessação dos inibidores dá-se um declínio rápido e posterior morte, enquanto que apenas uma injeção do vetor leva a que o efeito se prolongue com o tempo (Prabhakar *et al.*, 2015).

3.3 Administração por Via Intranasal

As substâncias para chegarem ao SNC têm que ter a capacidade de ultrapassar a BHE. No entanto, essa via pode ser circundada se estas forem administradas diretamente no SNC (encéfalo ou no LCR), ou então aproveitando os locais onde a BHE não está tão desenvolvida, como é caso da zona terminal do nervo olfativo. A administração intranasal pode ser feita através da via intraneural (por transporte axonal, o que requer maior tempo para que as substâncias cheguem ao local pretendido) ou extraneuronal (em que as substâncias fluem pelos canais perineurais, sendo o transporte feito mais rapidamente) (Thorne *et al.*, 1995).

Foi usada esta via de administração num estudo da Mucopolissacaridose do tipo I. Esta doença pertence ao grupo das doenças lisossomais, onde há deficiente produção de uma hidrolase lisossomal (α -L-iduronidase, ou IDUA). A consequência desta deficiência é a acumulação dos seus substratos, sulfato de heparina e/ou sulfato de dermatina, levando a um

dano celular permanente e progressivo, que se manifesta alterando a aparência, a integridade de órgãos e, na maioria dos casos, a função cognitiva (NINDS, 2015b). O tratamento dos sintomas periféricos consiste em Terapia Enzimática de Substituição mas a BHE não permite que haja o aporte das enzimas administradas para o SNC, ficando os sintomas centrais sem tratamento, sendo esse assegurado por Transplante Alogénico de Células Estaminais Hematopoéticas.

Assim, como alternativa a esse processo menos cómodo, estudou-se a expressão da enzima no SNC por administração nasal de vetores rAAV do serotipo 9. A administração foi feita em modelos animais da Mucopolissacaridose do tipo I, juntamente com ciclofosfamida (para prevenir resposta imune contra a enzima) e com manitol (para promover a difusão do vetor pelo cérebro). Seis semanas após a administração do vetor sacrificaram-se os animais e constatou-se que os níveis de IDUA em todas as regiões do cérebro atingiram valores corretivos e também se observaram níveis reduzidos dos depósitos de glicosaminoglicanos (McIvor *et al.*, 2014).

3.4 Administração por via Intravenosa

A via de administração de vetores de terapia génica potencialmente mais cómoda e mais facilmente reproduzida na clínica, é possivelmente a administração por via Intravenosa. Desta forma, os vetores são injetados na corrente sanguínea e, além de ultrapassarem a BHE, acumulam-se a nível do SNC.

Demonstrou-se recentemente que os vetores AAV do serotipo 9 administrados por via intravenosa em murganhos têm a capacidade atravessarem a BHE com tropismo e níveis de transdução que dependem da altura em que são administrados (Foust *et al.*, 2009). No caso dos adultos, estes parecem conseguir ultrapassar a BHE e infetar os astrócitos, relevante para potenciais tratamentos da Esclerose Lateral Amiotrófica - onde os astrócitos foram associados à progressão da doença (Yamanaka *et al.*, 2008).

Algumas doenças cerebrais, como é o caso do Glioblastoma multiforme (neoplasia cerebral primária mais frequente em adultos (Louis *et al.*, 2007)) caracterizam-se por uma angiogénese muito ativa, que pode ser contornada se forem administrados inibidores dos recetores de crescimento endoteliais. Um dos fatores de crescimento endotelial mais importante nos processos de angiogénese é o VEGF, que exerce a sua ação através da sua ligação a dois recetores: FLT1 e KDR (Chung & Ferrara, 2011). Num estudo recente (Shen *et al.*, 2015) administrou-se a nível sistémico um vetor viral que codificava a forma solúvel do produto do gene FLT1 (sFLT1) que, ao ser expresso, capta as moléculas de VEGF

circulantes. Esta abordagem é mais segura (Lukason *et al.*, 2011) em relação ao tratamento com bevacizumab, anticorpo monoclonal que é usado em muitos tumores pelo mesmo efeito (Simons & Eichmann, 2012), e verifica-se uma inibição da angiogénese cerebral devido a redução da proliferação endotelial, sem haver infiltração linfática ou perda neuronal.

4. Resultados promissores

4.1 Utilização de AAVs para desenvolvimento de Modelos Pré-Clínicos

Os Ensaios Pré-clínicos convencionais para os medicamentos convencionais têm como principais objetivos a avaliação dos efeitos e riscos potenciais, bem como a avaliação farmacológica, farmacocinética e toxicológica das moléculas (INFARMED). Para tal ser possível é necessário desenvolver modelos que mimetizem os processos celulares e moleculares da doença, bem como a correspondente sintomatologia (Aron Badin *et al.*, 2015).

Em baixo descreve-se um modelo adaptado às características das taupatias. As taupatias são um conjunto de doenças neurodegenerativas onde existe a deposição da proteína tau com perda de conformação normal, formando-se um produto característico destas doenças: os emaranhados neurofibrilares (ou NFT).

Os modelos de murganhos transgênicos que existiam eram limitados em relação ao que podiam oferecer para se avaliar a eficácia de alvos terapêuticos e criou-se um modelo de taupatia mais versátil. Como a natureza dos transgênicos é muito rígida, sob pena de criar uma nova linha transgênica, usou-se o vetor AAV-1 para expressar o gene mutante da proteína tau humana P301L na linha C57BL/6. Ao fim de seis meses notou-se que a expressão da proteína tau humana estava dispersa por uma larga área, o que levou a uma acumulação significativa de espécies de tau hiperfosforiladas.

Além disso foi também detetada taupatia por métodos imunohistoquímicos: por MCI (epitoma que deteta as alterações iniciais da conformação da proteína), e por Ab39 (que deteta apenas o emaranhado maduro), cinzento de Gallyas e Tioflavina T (colorações usadas para detetar quantidades vestigiais e agregados proteicos, respetivamente). A microscopia eletrónica mostrou deposição de filamentos. Observou-se também neuroinflamação com microgliose e astrocitose proeminentes, sem haver perda neurológica; no entanto, a acumulação de PSD95 (proteína pós sináptica) contribuiu para alterações comportamentais a nível de exploração, ansiedade e também memória e aprendizagem.

Assim, o estudo mostra que o modelo junta os marcadores bioquímicos e histológicos das doenças associadas à proteína tau, a neuroinflamação e alterações comportamentais, como é característico das taupatias, sem que haja morte neuronal (Cook *et al.*, 2015).

4.2 Ensaios Clínicos

O trabalho laboratorial em investigação biomédica culmina em muitos casos na realização de Ensaios Clínicos de várias ordens dos quais se procurou resumir alguns daqueles que recorreram à utilização de AAVs para terapia génica do SNC (Tabela 1):

Tabela 1 – Doenças alvo de Ensaios Clínicos tendo por base um vetor AAV.

Doença	Objetivo	Vetor usado	Resultado	Referência
Parkinson	<ul style="list-style-type: none">• Segurança• Exequibilidade	AAV2- <i>Neurturina</i>	<ul style="list-style-type: none">• Seguro• Exequível	(Bartus <i>et al.</i> , 2013)
Parkinson	<ul style="list-style-type: none">• Segurança• Eficácia	AAV2- <i>hADDC</i>	Ainda sem resultados Verificado em abril de 2015	NCT02418598
Alzheimer	<ul style="list-style-type: none">• Segurança• Tolerabilidade• Eficácia inicial	AAV2- <i>NGF</i>	<ul style="list-style-type: none">• Seguro• bem tolerado• expressão a longo prazo do NGF	(Rafii <i>et al.</i> , 2014)
Canavan	<ul style="list-style-type: none">• Segurança• Parâmetros de dosagem• Eficácia	rAAV- <i>ASPA</i>	<ul style="list-style-type: none">• Sem relação entre as reações adversas e o vetor/via de administração• Sem reações imunológicas inéditas	(Leone <i>et al.</i> , 2012)

5. Assuntos Regulamentares

A Entidade que regula este tipo de medicamentos (Medicamentos de Terapia Avançada) é, na Europa, a Agência Europeia do Medicamento (AEM ou EMA, em inglês). Segundo a EMA, os Medicamento de Terapia Avançada são “medicamentos feitos a partir de células ou genes”, diferindo dos medicamentos convencionais que são feitos a partir de químicos ou proteínas. Além disso estabelece uma distinção entre os vários Medicamentos de Terapia Avançada:

- Medicamentos de Terapia Genética: contêm genes que levam ao efeito terapêutico. O seu modo de ação consiste na inserção de genes recombinantes (segmento de DNA criado em laboratório e ligado a DNA de outra fonte- vetor) nas células utente. São usados para tratar uma variedade de doenças, como as genéticas, cancro e também doenças crónicas
- Medicamentos de Terapia com Células Somáticas: contêm células que foram alteradas em laboratório e que podem ter origem autóloga (do próprio utente), alogénica (de outro ser humano) ou xenogénica (de outra espécie). Estas podem ser usadas em prevenção, deteção ou tratamento de doenças.
- Medicamentos de Engenharia de Tecidos: são células ou tecidos modificados que são usados para reparar, regenerar ou substituir tecidos lesados.
- Medicamentos Combinados de Terapia Avançada: são medicamentos que usam um ou mais das estratégias acima descritas.

Como foi referido anteriormente, os Medicamentos de Terapia Avançada são regulados de forma diferente comparando com os medicamentos convencionais. O procedimento usado para a obtenção de AIM tem que ser necessariamente o Centralizado, submetendo a documentação à EMA, nomeadamente ao Comité das Terapias Avançadas (ATC). Este avalia o pedido e envia um parecer científico ao Comité de Produtos Medicinais para Uso Humano (CHMP) que, tendo em conta o parecer do ACT, se pronuncia (positiva ou negativamente) acerca à concessão da AIM.

Relativamente à informação a ser submetida à Agência, o requerente deve compilar um *dossier* com características e ensaios específicos para este tipo de medicamentos.

5.1 Ensaios exigidos para Medicamentos de Terapia Avançada

5.1.1. Farmacologia: estudos *in vitro* das ações relacionadas com a utilização terapêutica prevista – estudos farmacodinâmicos e Prova de Conceito (*Proof of Concept*), utilizando modelos e espécies animais relevantes a fim de demonstrar que a sequência de ácidos nucleicos atinge o órgão/células alvo (seletividade do alvo) e o grau de cumprimento da sua função (nível de expressão e atividade funcional).

5.1.2. Farmacocinética: Biodistribuição – investigações sobre persistência, eliminação e mobilização; avaliar riscos de transmissão para linha germinal. Os estudos de excreção são também importantes para avaliar o risco de transmissão a terceiros, importante para estabelecer o risco ambiental. A Farmacocinética é também avaliada para os produtos de expressão, como as proteínas.

5.1.3. Segurança: devem ser apresentados dados sobre a capacidade de o vetor utilizado formar novas estirpes, de rearranjar sequências genômicas existentes e da capacidade de proliferação neoplásica devido a mutagenicidade por inserção. No caso de Medicamentos de Terapia Avançada combinados, os estudos de segurança e eficácia devem ser concebidos para serem realizados no medicamento combinado no seu conjunto.

5.1.4. Toxicologia

Medicamento acabado: devem ser realizados ensaios sobre SA e excipientes e ser feita avaliação do efeito *in vivo* dos produtos relacionados com sequências ácido nucleico expressa que não se destinam à função fisiológica.

Toxicidade Dose Única: podem ser relacionadas com Farmacológicos e Farmacocinéticos de segurança para avaliar persistência. Se a dose única prolongar a funcionalidade da sequência de ácidos nucleicos – estudos de toxicidade repetida.

Testes de toxicidade de Dose Repetida: quando o medicamento for elaborado para ser administrado em doses no ser humano, tendo o modo e as condições de administração em conta a dose clínica planejada.

Toxicidade na função reprodutora e desenvolvimento: estudos sobre os efeitos na fertilidade e função reprodutora em geral; toxicidade embrionária/fetal e perinatal se houver transmissão para a linha germinal.

Genotoxicidade: Realização de estudos de genotoxicidade normalizados se for necessário avaliar impurezas específicas (componentes do sistema de distribuição) e que não possam ser avaliados de outra forma.

Carcinogenicidade: não são exigidos estudos normalizados de carcinogenicidade ao longo da vida em roedores. Em funções do tipo de produto, o potencial tumorigênico será avaliado em modelos in vivo/in vitro pertinentes.

5.2 Estudos suplementares

Estudos de integração: devem ser feitos, salvo se a sua inexistência tiver fundamento científico (as sequências de ácidos nucleicos não penetram no núcleo da célula). Neste caso e se os estudos de Biodistribuição mostrarem riscos de transmissão para a linha germinativa devem-se realizar.

Estudos de imunogenicidade e imunotoxicidade: desenvolver estudos para avaliar a capacidade que o medicamento tem para provocar uma resposta imunológica ou de, por outro lado, provocar toxicidade ao sistema imunitário.

5.3 Uso de auxiliares da ação do Medicamento de Terapia Avançada

A terapia pode ser composta apenas pelo Medicamento de Terapia Avançada ou então este pode auxiliado por dispositivos médicos, administração concomitante de terapia específica e/ou intervenção cirúrgica. Conforme o caso, o procedimento terapêutico, no seu conjunto, deve ser analisado e descrito bem como apresentar informações sobre a normalização e otimização dos procedimentos ao longo do desenvolvimento clínico.

As atividades anteriores, bem como as de acompanhamento do utente devem ver definidos os conhecimentos científicos especializados necessários para a sua realização (podem incluir-se o plano de formação nesses domínios dos profissionais de saúde que os desempenhem).

5.4 Características sobre os vetores

Devem-se prestar informações sobre os materiais de base utilizados para se obter o vetor viral inócuo. Além disso devem-se também fornecer dados sobre:

- A modificação genética efetuada;
- Análise da sequenciação;
- Atenuação da virulência;
- Tropismo para certos tipos de tecidos ou células;
- Patogenicidade e características da estirpe parental.

5.5 Pós-autorização

5.5.1 Rastreabilidade:

O proprietário do AIM deve estabelecer e manter um sistema que garanta que o produto final e que as suas matérias-primas possam ser rastreadas desde a fonte, passando pela produção, embalagem, armazenamento, transporte e distribuição ao hospital, clínica privada ou instituição onde é usada, sendo estes locais responsáveis por manter um sistema semelhante quer para o produto, quer para o utente, permitindo que se possa estabelecer uma ligação entre o utente que usufrui de um produto e que produtos foram usados no utente.

O proprietário da AIM tem que manter a informação 30 anos após a data de validade, sendo esta informação transferida para a Agência em caso de falência (se não for transferida para outra entidade). Deve manter o sistema intacto se AIM for suspensa ou cancelada.

5.5.2 Farmacovigilância e Sistema de Gestão dos Risco

Pormenorizar, no ato do pedido da AIM, as medidas previstas para assegurar o acompanhamento da eficácia e das RAM da terapia avançada.

Quando tal for necessário pode ser exigida a criação de um Sistema de Gestão dos Riscos para identificar, caracterizar, prevenir ou minimizar riscos relacionados com medicamentos de terapia avançada, além da avaliação do próprio sistema ou de estudos específicos pós-introdução no mercado, pelo proprietário da AIM, submetendo-os à apreciação por parte da EMA. Estes últimos devem ser incluídos nos relatórios periódicos atualizados de segurança referidos. Enviados imediatamente se forem pedidos ou automaticamente 6 meses após a AIM ser aprovada e anualmente nos dois anos seguintes. No fim deste período, a submissão automatia será trienal.

Este sistema deve também incluir estratégias para o acompanhamento a longo prazo da segurança e eficácia do Medicamento de Terapia Avançada.

6. Patentes e Empresas

Virovek

US Patent No. 8,945,918 B2 emitida a 3 de fevereiro de 2015

É uma tecnologia de produção de AAV que assenta na transferência do gene de interesse para o Baculovirus e deste para o AAV (tecnologia BAC-to-AAV). Aproveitando o sistema de expressão do Baculovirus conseguem produzir, por corrida, 1×10^{16} genes de vetores, muito superiores a qualquer outro sistema de produção de vetores (VIROVEK, 2015).

AAVLife

US Patent No. 9,066,966 emitida a 30 junho de 2015

Tecnologia baseada em vetores AAV para o tratamento da Ataxia de Friedreich, uma doença autossomal recessiva que se manifesta ainda na infância ou adolescência, levando a cardiomiopatia acompanhada de sintomas neurológicos. A tecnologia assenta na introdução do gene *FTX* no tecido cardíaco (codifica Frataxina - proteína com papel crítica na regulação mitocondrial). Estão em andamento ensaios para a determinação da dosagem e para a escolha da via de administração com o objetivo de se começar um Ensaio Clínico em 2016 (AAVLife, 2015).

Hospital Pediátrico de Filadélfia

WO 2015013313 A3, emitida a 29 de janeiro de 2015

A patente abrange o AAV-Rh74 e vetores associados e, no seu conjunto, os seus métodos de transferência. Em particular direcionamento de polinucleótidos para células, tecidos ou órgão com a finalidade de expressão de genes codificadores de proteínas e peptídeos, bem como polinucleótidos que funcionem como ou que sejam inibidores de sequência de ácidos nucleicos (HIGH *et al.*, 2015).

Mercado e Projeções

A nível Europeu apenas um medicamento tendo por base tecnologia genética foi aprovado. O número parece fraco mas o crescente aumento da qualidade e da quantidade dos *pipelines* faz prever um tremendo potencial neste tipo de tecnologia. Tem havido um aumento do interesse por parte dos investidores de capital de risco: só nos Estados Unidos desde janeiro de 2013 até abril de 2014 foram investidos \$600M e estima-se que o mercado das terapias genéticas valha 11 mil milhões de Dólares em 2025, o que representa uma taxa anual de crescimento de 48.9% (KXNEWS & ReporterLinker, 2015).

7. Conclusão

A terapia genética pode ser uma resposta a muitas dos problemas por resolver na Medicina moderna. No entanto, a sua aplicabilidade vai estar sempre dependente do conhecimento que se tem da doença, quer a nível molecular, celular ou fenotípico, dos modelos que simulam a doença e onde são efetuados os estudos e, por fim, do próprio conhecimento que se tem da tecnologia usada para fazer as alterações genéticas necessárias para estudar a doença.

A forma como os vetores alcançam o local pretendido pode estar dependente da via de administração e se o serotipo tem, ou não, a capacidade de contornar a Barreira Hemato Encefálica, se tal for o caso.

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares do AAV e das doenças estão continuamente a ser atualizados, permitindo também abordagens cada vez mais próximas do sucesso. No entanto, ainda são poucos os Ensaios Clínicos em fases avançadas.

A aprovação de novos medicamentos de terapia genética está sujeita a testes suplementares mais exigentes e também tem em conta a criação e manutenção de sistemas de gestão de risco e de Farmacovigilância.

A terapia genética é então uma ferramenta com muito potencial terapêutico, como ilustrado ao longo do trabalho no entanto, levanta questões éticas aquando do seu uso. Por exemplo, o facto de ao serem descobertas novas sequências de nucleótidos com funções que até agora eram desconhecidas leva à posterior patenteação e proteção intelectual da mesma. A questão coloca-se na sua patenteabilidade, algo que foi impedido pelo permitido pelo Supremo Tribunal dos Estados Unidos em 2013 que, no entanto, permitiu a patenteabilidade de tecnologias recombinantes.

Referências Bibliográficas

- AAVLife (2015) - Friedreich's Ataxia. <http://www.aavlife.com/contact/> [Acedido a 10 de setembro de 2015]
- Akache, B., Grimm, D., Shen, X., Fuess, S., Yant, S.R., Glazer, D.S., Park, J. & Kay, M.A. (2007) - A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adeno-associated virus 2 and 8. *Mol Ther*, **15**, 330-339.
- Aron Badin, R., Vadori, M., Cozzi, E. & Hantraye, P. (2015) - Translational research for Parkinsons disease: The value of pre-clinical primate models. *Eur J Pharmacol*, **759**, 118-126.
- Atchison, R.W., Casto, B.C. & Hammon, W.M. (1965) - ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science*, **149**, 754-756.
- Balakrishnan, B. & Jayandharan, G.R. (2014) - Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther*, **14**, 86-100.
- Bartus, R.T., Baumann, T.L., Siffert, J., Herzog, C.D., Alterman, R., Boulis, N., Turner, D.A., Stacy, M., Lang, A.E., Lozano, A.M. & Olanow, C.W. (2013) Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients *Neurology*, pp. 1698-1701.
- Chung, A.S. & Ferrara, N. (2011) - Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **27**, 563-584.
- Colmers, W.F., Lukowiak, K. & Pittman, Q.J. (1987) - Presynaptic action of neuropeptide Y in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol*, **383**, 285-299.
- Cook, C., Kang, S.S., Carlomagno, Y., Lin, W.L., Yue, M., Kurti, A., Shinohara, M., Jansen-West, K., Perkerson, E., Castanedes-Casey, M., Rousseau, L., Phillips, V., Bu, G., Dickson, D.W., Petrucelli, L. & Fryer, J.D. (2015) - Tau deposition drives neuropathological, inflammatory and behavioral abnormalities independently of neuronal loss in a novel mouse model. *Hum Mol Genet*.
- Curatolo, P. & Maria, B. (2013) - Chapter 38 – Tuberous sclerosis. **III**, 323–331.
- Davson, H. & Spaziani, E. (1959) - The blood-brain barrier and the extracellular space of brain. *J Physiol*, **149**, 135-143.
- Daya, S. & Berns, K.I. (2008) - Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors *Clin Microbiol Rev*, pp. 583-593.
- Ehrlich, P. (1885) - Das sauerstoffbedürfnis des organismus *Eine Farbenanalytische Studie*, Berlin.
- Ehrlich, P. (1904) - Ueber die beziehungen von chemischer constitution, verteilung und pharmakologischer wirkung *Gesammelte Arbeiten zur Immunitaetsforschung*, Berlin, pp. 574.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M. & Kaspar, B.K. (2009) - Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat Biotechnol*, **27**, 59-65.
- Freitas e Costa, M. (2014) - *Dicionário de Termos Médicos*. Porto Editora.
- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. & Riggs, A.D. (1979) - Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin.

- Goldman, E. (1904) - Vitalfarbung am zentralnervensystem *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss*, pp. 1-60.
- Gonçalves, M.A. (2005) - Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal*, **2**, 43.
- Hermonat, P.L. & Muzyczka, N. (1984) - Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells.
- High, K., YAZICIOGLU, M., ANGUELA, X. & PHILADELPHIA, T.C.S.H.O. (2015) VARIANT AAV AND COMPOSITIONS, METHODS AND USES FOR GENE TRANSFER TO CELLS, ORGANS AND TISSUES.
- INFARMED - Avaliação Pré-Clínica.
http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_PRE_CLINICA [Acedido a 6 de setembro de 2015]
- Ke, J., Zheng, L.W. & Cheung, L.K. (2011) - Orthopaedic gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Arch Oral Biol*, **56**, 619-628.
- Kerr, J., Cotmore, S. & Bloomm, M.E. (2005) - *Parvoviruses*. Edward Arnold, London.
- KXNEWS & ReporterLinker (2015) - Gene Therapy Market, 2015 - 2025.
<http://www.kxnet.com/story/29055602/gene-therapy-market-2015-2025> [Acedido a 10 de setembro de 2015]
- Laplante, M. & Sabatini, D.M. (2012) - mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, **149**, 274-293.
- Leone, P., Shera, D., McPhee, S.W., Francis, J.S., Kolodny, E.H., Bilaniuk, L.T., Wang, D.J., Assadi, M., Goldfarb, O., Goldman, H.W., Freese, A., Young, D., Durning, M.J., Samulski, R.J. & Janson, C.G. (2012) - Long-Term Follow-Up After Gene Therapy for Canavan Disease. *Sci Transl Med*, **4**, 165ra163.
- Lewandowsky, M. (1900) - Zur lehre von der cerebrosinalflussigkeit *Z Klin Med*, pp. 480-494.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. (2007) - The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, **114**, 97-109.
- Lukason, M., DuFresne, E., Rubin, H., Pechan, P., Li, Q., Kim, I., Kiss, S., Flaxel, C., Collins, M., Miller, J., Hauswirth, W., Maclachlan, T., Wadsworth, S. & Scaria, A. (2011) - Inhibition of choroidal neovascularization in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an AAV2 vector expressing a novel anti-VEGF molecule. *Mol Ther*, **19**, 260-265.
- Maynard, E.A., Schultz, R.L. & Pease, D.C. (1957) - Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex. *Am J Anat*, **100**, 409-433.
- McIvor, R.S., Nan, Z., Podetz-Pedersen, K.M., Kitto, K., Hanson, L.R. & Wolf, D.A. (2014) - Intrathecal and intranasal infusion of adeno-associated virus vector: non-invasive routes of administration achieving corrective levels of iduronidase expression throughout the brain for gene therapy of mucopolysaccharidosis type I. **111**, S75-S76.
- Meikle, L., Pollizzi, K., Egnor, A., Kramvis, I., Lane, H., Sahin, M. & Kwiatkowski, D.J. (2008) - Response of a Neuronal Model of Tuberous Sclerosis to Mammalian Target of Rapamycin

(mTOR) Inhibitors: Effects on mTORC1 and Akt Signaling Lead to Improved Survival and Function.

Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N.E., Popa-Wagner, R. & Kleinschmidt, J.A. (2012) - Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein. *J Virol*, **86**, 13038-13048.

Ni, T.H., McDonald, W.F., Zolotukhin, I., Melendy, T., Waga, S., Stillman, B. & Muzyczka, N. (1998) - Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol*, **72**, 2777-2787.

NINDS (2015a) Epilepsy Information Page: National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). <http://www.ninds.nih.gov/disorders/epilepsy/epilepsy.htm> [Acedido em 7 de setembro de 2015]

NINDS (2015b) Mucopolysaccharidoses Information Page: National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). <http://www.ninds.nih.gov/disorders/mucopolysaccharidoses/mucopolysaccharidoses.htm> [Acedido em 7 de setembro de 2015]

Noe, F., Vaghi, V., Balducci, C., Fitzsimons, H., Zardoni, D., Sperk, G., Carli, M., J Doring, M. & Vezzani, A. (2010) - Anticonvulsant effects and behavioural outcomes of rAAV serotype 1 vector-mediated neuropeptide Y overexpression in rat hippocampus. *Gene Therapy*, **17**, 643-652.

Nonnenmacher, M. & Weber, T. (2012) - Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*, **19**, 649-658.

Pereira, D.J., McCarty, D.M. & Muzyczka, N. (1997) - The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol*, **71**, 1079-1088.

PHGU (2002) Gene therapy: Treating the bubble babies. <http://genome.wellcome.ac.uk/doc%5Fwtd020936.html> [Acedido a 4 de setembro de 2015]

Prabhakar, S., Zhang, X., Goto, J., Han, S., Lai, C., Bronson, R., Sena-Esteves, M., Ramesh, V., Stemmer-Rachamimov, A., Kwiatkowski, D.J. & Breakefield, X.O. (2015) - Survival benefit and phenotypic improvement by hamartin gene therapy in a tuberous sclerosis mouse brain model. *Neurobiol Dis*, **82**, 22-31.

R M Kotin, M.S., R J Samulski, X D Zhu, L Hunter, CA Laughlin, S McLaughlin, N Muzyczka, M Rocchi, K I Berns (1990) - Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Nat Acad Sci USA* **87**: 2211-2215. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**.

Rafii, M.S., Baumann, T.L., Bakay, R.A., Ostrove, J.M., Siffert, J., Fleisher, A.S., Herzog, C.D., Barba, D., Pay, M., Salmon, D.P., Chu, Y., Kordower, J.H., Bishop, K., Keator, D., Potkin, S. & Bartus, R.T. (2014) - A phase I study of stereotactic gene delivery of AAV2-NGF for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, **10**, 571-581.

Shen, F., Mao, L., Zhu, W., Lawton, M.T., Pechan, P., Colosi, P., Wu, Z., Scaria, A. & Su, H. (2015) - Inhibition of pathological brain angiogenesis through systemic delivery of AAV vector expressing soluble FLT1. *Gene Therapy*.

Simons, M. & Eichmann, A. (2012) - "On-Target" Cardiac Effects of Anticancer Drugs: Lessons From New Biology*. *J Am Coll Cardiol*, **60**, 626-627.

- Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. & Kleinschmidt, J.A. (2006) - Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol*, **80**, 11040-11054.
- Sonntag, F., Schmidt, K. & Kleinschmidt, J.A. (2010) - A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 10220-10225.
- Srivastava, A., Lusby, E.W. & Berns, K.I. (1983) - Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol*, **45**, 555-564.
- Tenenbaum, L., Lehtonen, E. & Monahan, P.E. (2003) - Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors.
- Thorne, R.G., Emory, C.R., Ala, T.A. & Frey, W.H., 2nd (1995) - Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res*, **692**, 278-282.
- UniQure (2012) Glybera. <http://www.uniqure.com/products/glybera/> [Acedido a 7 d setembro de 2015]
- VIROVEK (2015) AAV Production Technology. <http://www.virovek.com/company/aav-production-technology/> [Acedido a 9 de setembro de 2015]
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. & Cleveland, D.W. (2008) - Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, **11**, 251-253.