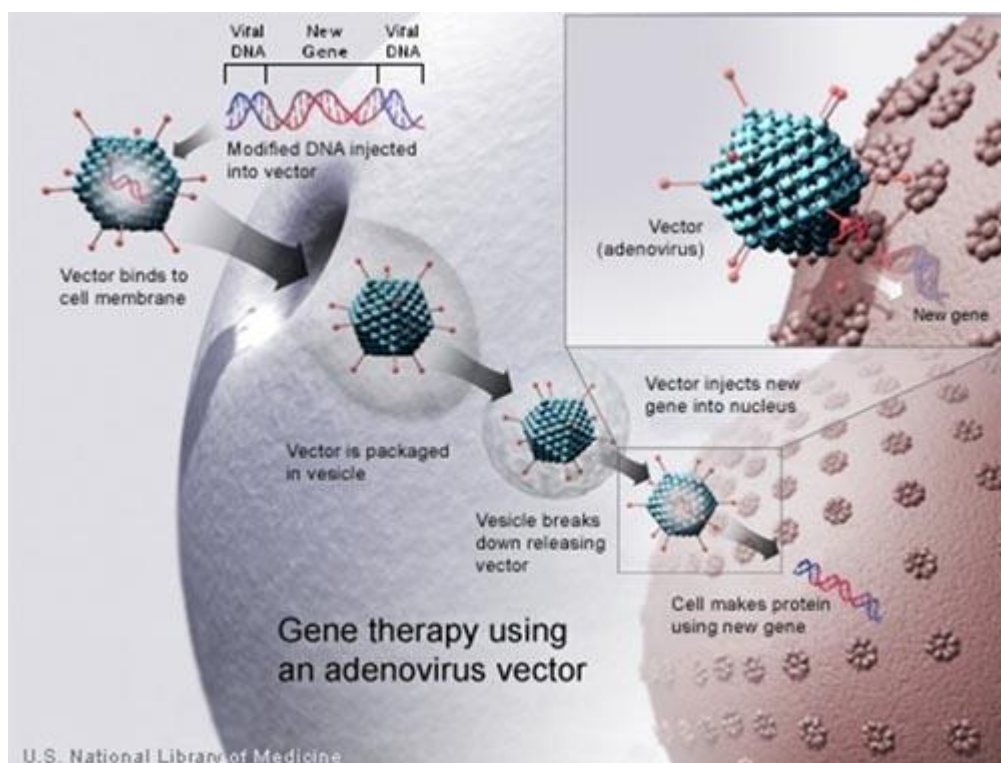


## Terapia genética ou gênica – A Cura nunca esteve tão próxima!

### Visão geral

Na esclerose lateral amiotrófica (ELA), a **terapia genética** pode ajudar a fornecer uma proteína benéfica para salvar as células nervosas que estão morrendo. A **terapia gênica** pode ser simplesmente um meio de aumentar a produção no local de um fator útil, em locais onde as células nervosas estão com problemas. Os pesquisadores podem desarmar muitos tipos de vírus e colocar as instruções genéticas para produzir proteínas terapêuticas. **Os vírus redesenhados são chamados vetores.** Eles são simplesmente portadores de genes terapêuticos. O conhecimento das mutações do SOD1 ligadas a algumas formas de ELA produziu um vasto corpo de evidências, apontando para uma estratégia geral para a doença que pode ser implementada com sucesso por meio de terapia genética.



### O que é terapia genética?

Terapia gênica é o uso de instruções genéticas para produzir uma proteína para tratar um distúrbio ou deficiência. Pode ajudar em uma doença, mesmo que a terapia não atinja diretamente um defeito genético que causa a doença. Na esclerose lateral amiotrófica (ELA), a terapia genética pode ajudar se for capaz de fornecer uma proteína benéfica, para salvar células nervosas moribundas. A terapia gênica é simplesmente um meio de aumentar a produção no local de um fator trófico (para melhorar o crescimento), em locais onde as células nervosas estão com problemas.

Os genes são as moléculas em todas as células do nosso corpo que carregam as instruções para produzir todos os materiais que compõem o corpo. Na década de 1950, os cientistas determinaram que os genes codificam precisamente as proteínas, com uma sequência que especifica a ordem dos blocos

de construção das proteínas, os aminoácidos. Cada gene corresponde a uma proteína. Cada base de um gene codifica um aminoácido. A ordem das bases em um gene produz a cadeia ordenada de aminoácidos que produz uma proteína em funcionamento.

Na virada do século atual, os cientistas determinaram, em forma de rascunho, a sequência de todos os genes humanos. A essa altura, eles também sabiam como criar uma construção genética e movê-la para dentro das células, para que as células produzissem a proteína correspondente.

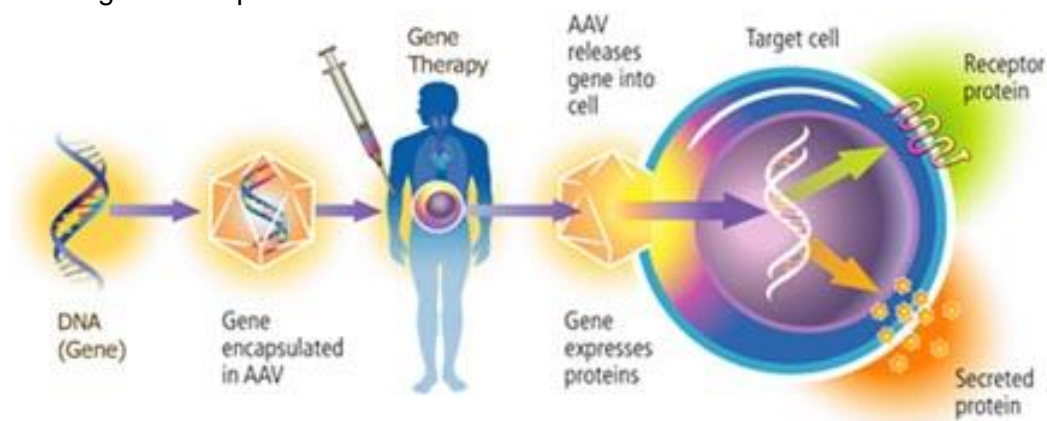
Em algumas doenças, os pesquisadores já sabem que um gene defeituoso não é capaz de funcionar. Eles têm os meios possíveis para curar a doença, substituindo o gene defeituoso por uma cópia de trabalho correta. **Na ELA, apenas alguns por cento dos pacientes têm um defeito genético conhecido. Quanto ao resto, pode ser um gene não descoberto que é o problema, ou podem ser vários.** Mas a terapia genética ainda pode ser projetada para ajudar pacientes com ELA, fornecendo proteínas de suporte para células nervosas.

### Vetores entregam genes

Os **genes** normalmente residem no núcleo, o núcleo de uma **célula**, separado dos materiais circundantes por uma membrana. Os **cromossomos** são as estruturas dentro do núcleo celular que contêm o **DNA** que compreende os **genes**. É muito desafiador fazer com que um gene fabricado em laboratório atravesse o envelope externo de uma célula e a membrana nuclear para alcançar os cromossomos.

Cientistas que estudam **vírus** descobriram a própria solução da natureza para o problema de mover genes. Os vírus são essencialmente genes que evoluíram para sequestrar células, em vez de formar células para si mesmos. Portanto, os vírus têm estratégias para entrar nas células e assumir o processo de produção de proteínas, para produzir o vírus. **Os pesquisadores descobriram como usar vírus como cavalos de Tróia, para trazer genes que podem realizar reparos genéticos, substituindo o DNA defeituoso.**

Em muitos vírus, os pesquisadores podem desarmar os genes responsáveis pelas propriedades prejudiciais e, em vez disso, colocar instruções genéticas para produzir proteínas terapêuticas. Esses vírus, redesenhados pelos pesquisadores, são chamados de **vetores**. Eles são simplesmente um meio de contrabandear genes terapêuticos.



### **Por que a terapia genética ainda é experimental?**

Os investigadores devem demonstrar que o vetor viral não voltará a uma forma infecciosa ou causará efeitos colaterais.

Os genes normalmente são lidos somente quando uma proteína é necessária e operam sob controle de feedback. Se já houver quantidades adequadas de proteína, o gene será desativado. Os cientistas devem ser capazes de conceber os elementos de troca adequados para acompanhar um gene terapêutico, para garantir que um gene seja expresso em quantidades adequadas e apenas no tecido alvo pretendido.

Para avaliar a entrega adequada do vetor e os níveis suficientes de expressão gênica, os pesquisadores precisam ter modelos animais que reflitam as principais manifestações de uma doença humana. Apesar do trabalho pré-clínico com animais, nem sempre é possível extrapolar para os pacientes.

O sistema imunológico de um paciente pode montar um ataque aos vetores virais (afinal, é isso que o sistema imunológico está preparado para fazer) ou ao produto genético terapêutico recém-introduzido.

### **Quais são os desafios da terapia genética na ELA?**

Na ELA, alguns por cento dos pacientes têm um defeito conhecido em um gene. Esse erro genético, no gene que codifica a proteína SOD1, produz uma doença não diferente de qualquer outra forma de ELA, herdada ou não. A terapia gênica pode ser projetada para um defeito específico de SOD1, mas essa terapia pode ou não funcionar para outros pacientes com ELA.

O que é encorajador é que o conhecimento das mutações no SOD1 produziu um vasto corpo de evidências para o que dá errado em outros casos de ELA. E essa evidência está apontando para uma estratégia geral que pode ser implementada com sucesso por meio da terapia genética.

### **Contribuições de outras células na ELA**

A pesquisa sobre a ELA produziu a noção de que a vizinhança ao redor dos neurônios motores pode ser nutritiva ou prejudicial para essas células cruciais afetadas na ELA. Mesmo que um neurônio carregue um gene SOD1 mutado, essa célula nervosa poderá sobreviver se as células de suporte vizinhas, a glia, tiverem o gene normal.

As células da glia circundam os neurônios. Algumas funções da glia produzem as marcas de dano no sistema nervoso, seja inflamação ou cicatrização. Outras ações da glia são protetoras, por exemplo, varrendo o excesso de moléculas de sinal excitatório antes que possam causar danos. A terapia gênica na ELA pode ser capaz de atingir células gliais e neurônios, produzindo efeitos positivos.

### **Impulsionando fatores tróficos úteis**

Estudos em modelos animais de ELA mostram aumento da sobrevivência após tratamento com fatores tróficos, pequenas proteínas que apoiam o crescimento e as atividades metabólicas das células nervosas, mais recentemente com IGF-1 e também após fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). No entanto, os ensaios clínicos de fatores tróficos em pacientes com ELA têm sido decepcionantes. O desafio de entregar essas proteínas ao local do dano provavelmente é a causa subjacente das falhas na clínica.

A terapia gênica pode ser a maneira de fornecer um suprimento constante de fatores tróficos aos neurônios danificados na ELA, diretamente no local onde o dano existe. Existem várias vias de pesquisa que buscam implementar terapias gênicas para fornecer fatores tróficos e estar incentivando a entrada em ensaios clínicos o mais rápido possível.

### **Terapia Genética para a ELA – Uma Perspectiva**

Os recentes avanços na terapia gênica abrem uma nova perspectiva para tratar esse distúrbio - particularmente para as formas genéticas caracterizadas. Abordagens da terapia gênica, envolvendo a administração de anti-sentido oligonucleotídeos no sistema nervoso central (SNC) estão sendo testados em ensaios clínicos para pacientes com mutações nos genes SOD1 ou C9orf72. Os vetores lentivirais podem ser usados para fornecer sequências terapêuticas para transduzir de maneira estável os neurônios motores no SNC. Os vetores derivados do vírus adenoassociado (AAV) podem ser testados em genes alvo de forma eficiente e foram testados em vários contextos pré-clínicos com resultados promissores.

Recentemente, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o **Zolgensma**, um tratamento mediado por AAV para outro DNM - a forma infantil de atrofia muscular espinhal (AME). **Dado o progresso acelerado em terapia genética, é potencialmente um caminho promissor para o desenvolvimento de uma cura eficiente e segura da ELA.**

### **Introdução**

A ELA é uma MND fatal que leva à paralisia e morte prematura nos pacientes afetados. Apesar de décadas de esforços persistentes para caracterizar e desenvolver tratamentos para esta doença, nenhuma cura eficaz está disponível para pacientes com ELA.

O fracasso das abordagens farmacológicas e intervencionistas tradicionais pode estar associado a atrasos diagnóstico, complexidade da doença e desafios envolvidos no desenvolvimento de um medicamento que pode atingir eficientemente o sistema nervoso central (SNC).

A terapia gênica surgiu como uma opção promissora de tratamento para pacientes com ELA. Esforços de pesquisa foram recentemente transduzidos para pacientes com ELA nos quais o gene causador e um patológico mecanismo foi identificado. Especificamente, abordagens de terapia genética não viral entraram em ensaios clínicos

para duas formas familiares de ELA (SOD1) e a forma mais comum de ELA causada por mutações no quadro de leitura aberto do cromossomo 9 72 Gene (C9orf72).

A terapia gênica pode ser usada para fornecer a cópia normal de um gene mutado (substituição gênica); reduzir a expressão do gene causador do RNA (nocaute genético); para introduzir um fator protetor ou benéfico (adição de genes); ou para modificar o genoma mutante.

Para ajustar as abordagens da terapia genética e maximizar as chances de um efeito terapêutico, vários parâmetros devem ser considerados. É importante definir a natureza do material genético (transgene)

usado para correção de genes, a ferramenta de entrega usada para alcançar as células alvo e o modo de administração, que pode ser *ex vivo* ou *in vivo*. A terapia gênica *ex vivo* consiste em genética modificação de células *in vitro* e subsequente implantação no hospedeiro receptor.

Por outro lado, a terapia gênica *in vivo* envolve a introdução direta de um gene terapêutico na célula alvo usando ou não portadores virais.

Sequências nuas de ácidos nucleicos, isto é, plasmídeos de DNA, oligonucleotídeos baseados em RNA ou DNA ou RNA silenciador, podem ser entregues diretamente na célula hospedeira ou podem ser quimicamente modificados para melhorar sua estabilidade. Vários vírus geneticamente modificados são usados como vetores de terapia genética, que podem diferir em tropismo, interação do genoma do hospedeiro, capacidade de empacotamento, resposta imune nas células-alvo e eficiência na transdução.

O objetivo é apresentar uma visão geral das abordagens de terapia genética para ELA. Descreveremos a jornada desses tratamentos desde o teste pré-clínico até a transdução clínica, destacando o potencial das estratégias mediadas por vírus para transduzir estavelmente MNs no SNC. Em particular, apresentaremos as vantagens dos vetores virais derivados do vírus adenoassociado (AAV) para corrigir de maneira estável o fenótipo da doença nos tecidos predominantemente afetados na ELA. Descreveremos, em particular, como os AAV estão mudando o cenário de tratamento para os casos familiares de ELA e, graças à sua versatilidade, podem oferecer perspectivas terapêuticas para outros casos de ELA, como esporádica.

### **ELA, uma doença letal e incurável**

A maioria dos casos de ELA (90% a 95%) é esporádica (sALS) sem histórico familiar. No entanto, alguns casos têm uma história familiar (FALS) de mutações genéticas, o que representa 5% a 10% de todas as formas. Curiosamente, genes mutantes típicos encontrados em pacientes com SAF também são encontrados em alguns casos de SAV [18,19]. Até o momento, a etiologia genética de aproximadamente dois terços dos FALS e cerca de 10% dos esporádicos.

A doença é descoberta, identificando mais de 30 genes mutados. A maioria desses genes confere uma herança dominante, que nem sempre é totalmente penetrante, enquanto alguns deles são recessivos ou ligados ao X.

A ELA é uma doença rara, mas sua incidência está prevista para aumentar nas próximas décadas devido ao aumento progressivo do envelhecimento da população, especialmente nas sociedades ocidentais. Na Europa, a incidência é homogênea (cerca de 2,16 por 100.000 pessoas / ano); com mais homens afetados em comparação com mulheres. Em todo o mundo, varia entre 0,42-5,3 por 100.000 pessoas-ano. O início da ELA é geralmente entre 40 e 70 anos, chegando a 58-63 anos para formas esporádicas e 47-52 anos para formas familiares. Os pacientes são diagnosticados com base na presença de um início insidioso e assimétrico de fraqueza distal indolor ou perda de massa muscular, bem como um padrão diafragmático de fraqueza respiratória. A principal causa de morte é a insuficiência respiratória, ocorrendo aproximadamente 3 a 5 anos após o diagnóstico.

Apesar de décadas de pesquisa, atualmente apenas dois medicamentos não curativos estão disponíveis para pacientes com ELA: Rilutek (Riluzol) e Radicava (Edaravone). Embora esses dois medicamentos possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes, diminuindo a progressão da doença, eles não podem curar o distúrbio.

Aprovado em 1995, o Riluzol é um antagonista do glutamato que prolonga a sobrevivência dos pacientes por alguns meses [28]. A Edaravone, por outro lado, foi aprovada recentemente (2017) pelo FDA. Ele atua como um limpador de radicais livres que reduz o estresse oxidativo e protege os neurônios, retardando o declínio da doença em uma subpopulação de pacientes com ELA. No entanto, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) não aprovou esse medicamento, pois o Comitê de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) estipulou um estudo adicional de sobrevivência.

### **Casos Familiares de ELA, Mecanismos Patológicos das Mutações SOD1 e C9orf72**

As mutações genéticas mais comuns responsáveis por FALS são encontradas no **SOD1**, proteína de ligação ao DNA TAR de 43 kDa (**TDP-43**), fundida no sarcoma (**FUS**) e nos genes **C9orf72**. Em cerca de 95% dos casos de ELA (com ou sem demência frontotemporal), a proteína de ligação a RNA / DNA codificada por **TDP-43** é um componente importante da inclusão neuronal positiva para **ubiquitina** encontrada nos tecidos neurais post mortem [31,32]. É, portanto, uma das principais características patológicas da doença.

Mutações no USF também são encontradas em seu domínio de ligação a RNA. Isso indica que o metabolismo anormal do RNA é um fator importante na degeneração do MN. Recentemente, um oligonucleotídeo antisense específico do paciente (ASO) foi desenvolvido para uma jovem mulher com FUS-ELA, sugerindo a possibilidade de adaptar abordagens de terapia genética a outros casos de FALS. No entanto, o desenvolvimento e a transdução de abordagens de terapia genética para SOD1-ELA e C9orf72-ELA estão mais avançados.

Para essas duas formas, abordagens mediadas não virais estão sendo testadas em ensaios clínicos e várias terapias gênicas mediadas por AAV foram testadas em modelos pré-clínicos das doenças, que serão transduzidas em um futuro próximo. Acreditamos que esses esforços servirão de paradigma para o desenvolvimento de tratamentos mais amplos - para FALS causados por mutações em outros genes, bem como para sALS com ou sem mutações genéticas. Assim, focaremos essas duas formas de FALS, revisando o progresso em direção ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficientes.

As primeiras mutações causais relacionadas à ELA foram descritas no gene SOD1 em 1993. Desde então, mais de 180 mutações foram descritas nesse gene principalmente devido à análise populacional. O gene SOD1 codifica a enzima superóxido dismutase 1 de Cu / Zn, uma proteína antioxidante homodimérica de 32-kDa, cuja localização pode variar do núcleo ao citosol ou espaço intermembranar mitocondrial. Ele protege a célula das espécies reativas de oxigênio, convertendo superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio [38]. Mutações no SOD1 ocorrem em cerca de 12% dos pacientes diagnosticados com a forma familiar, mas também em uma pequena porcentagem de casos de SALS. A maioria deles são mutações pontuais de aminoácidos altamente conservados que podem causar instabilidade conformacional ou desdobramento da própria proteína. A proteína mutante pode

desencadear neurotoxicidade por ativar vários eventos, como resposta desdobrada de proteínas, dano mitocondrial ou estresse do retículo endoplasmático. A heterogeneidade relatada na idade de início e fenótipo nos pacientes é devida a diferentes tipos de mutações que resultam em ganho de toxicidade, em vez de perda de atividade enzimática.

Análises recentes de ligação e estudos de associação genômica (GWAS) envolvendo pessoas afetadas pela ELA identificaram um locus mutante no braço curto do cromossomo 9 (9p21), responsável por 40% dos FALS e quase um quarto dos SALS.

Em pacientes com ELA, o gene C9orf72 é caracterizado por maior expansão repetida de hexanucleotídeo (HRE) do GGGGCC (G4C2) no primeiro íntron (> 70 HREs) do que em indivíduos saudáveis (menos de 30 HREs). Essa expansão foi encontrada em pessoas afetadas por demência frontotemporal (DFT), uma atrofia neuronal progressiva com perda de neurônios nos lobos frontal e temporal, caracterizada por alterações comportamentais e de personalidade e comprometimento gradual das habilidades de linguagem. Até 50% dos pacientes com ELA podem desenvolver sintomas consistentes com o diagnóstico de DFT, com sobreposição de sintomas clínicos e mutações genéticas.

O gene C9orf72 é composto de 11 exons e pode ser transcrito em três pré-mRNAs: V1, V2 e V3, onde as variantes de transcrição V1 e V3 retêm o HRE no primeiro íntron nos casos de ELA. As variantes de transcrição V2 e V3 codificam a forma longa da proteína C9orf72, enquanto a variante de transcrição V1 codifica a forma curta [45]. A proteína C9orf72 é altamente expressa em neurônios e as duas isoformas podem ter localização diferente nas células (citoplasmática para a proteína longa e membrana nuclear para a curta) [46]. A proteína codificada pelo gene C9orf72 pode ter um papel no tráfego celular devido à co-localização com proteínas Rab [47,48], regulando a endocitose e a autofagia devido à sua ação como fator de troca de nucleotídeos de guanina [49].

Existem três mecanismos não exclusivos conhecidos que sugerem explicações sobre como os EREs causam a doença:

1. A presença de expansão repetida causa regulação negativa da expressão do gene C9orf72, levando a uma perda de função;
2. Os HREs são transcritos bidirecionalmente em RNAs contendo repetições de G4C2 e C4G2 que se agregam em núcleos de células, sequestrando proteínas de ligação a RNA (RBPs) em focos de RNA intranucleares;
3. Os RNAs contendo repetição podem se mover para o citoplasma, onde podem ser transduzidos em proteínas de repetição de dipeptídeos (DPRs) por meio de um mecanismo de transdução não canônico conhecido como transdução não dependente de AUG (RAN) associada a repetição.

O debate sobre esses diferentes mecanismos patogênicos está em andamento. Não está claro qual pode-se considerar o fator causador da neurotoxicidade do C9orf72-ELA e, portanto, são necessários mais estudos, principalmente para esclarecer a função da proteína C9orf72 e como o HRE pode levar à morte neuronal.

### **Modelos de camundongos para SOD1 e C9orf72-ELA**

Vários modelos animais de ELA foram gerados para entender os mecanismos patológicos da ELA e testar abordagens terapêuticas. Os testes pré-clínicos de terapias genéticas para SOD1 e C9orf72-ELA foram realizados principalmente em modelos de roedores.

Como descrito anteriormente, mutações no gene SOD1 resultam em um ganho tóxico de mecanismos de função da enzima codificada que, por razões desconhecidas, adquire propriedades neurotóxicas. Camundongos knockout para SOD1 tiveram um desenvolvimento normal e não apresentaram fenótipo da ELA até os seis meses de idade. Em contraste, camundongos transgênicos que superexpressam formas mutantes do gene humano SOD1 recapitulam a maioria das características patológicas da ELA. O modelo mais comum de camundongo para estudos pré-clínicos de ELA foi gerado em 1994, quando várias cópias do transgene SOD1 humano, portando uma única substituição de aminoácido glicina por alanina no códon 93 (SOD1-G93A), foram introduzidas na genética mista B6SJL fundo. Os camundongos SOD1-G93A tiveram uma vida útil reduzida, com uma sobrevida média de cerca de 130 dias, paralisia progressiva e perda de NM na medula espinhal.

Modelos semelhantes de camundongos com expectativa de vida mais longa (sobrevida média de cerca de 157 dias) foram subsequentemente gerados, cruzando o SOD1-G93A com o C57BL / 6J (B6.SOD1-G93A). Após redução espontânea do transgene, o número de cópias nos camundongos congênitos C57BL / 6J, um modelo alternativo de camundongo SOD1 foi gerado, com um fenótipo menos agressivo e uma vida média de cerca de 300 dias (cópia baixa B6.SOD1-G93A) (de Jackson Laboratory Bar Harbor, ME EUA; Estoque nº 002299). Um modelo de rato SOD1 também foi gerado pela super expressão do transgene SOD1-G93A, que exhibe paralisia e degeneração dos MNs superiores e inferiores e uma sobrevida média de cerca de 130 dias. Esses modelos foram usados para testar abordagens de terapia genética para o SOD1-ELA para apoiar ensaios clínicos em andamento ou planejados, conforme detalhado nos parágrafos seguintes.

Após a descoberta do HRE patológico em C9orf72, vários grupos geraram e caracterizaram modelos de camundongos contendo um cromossomo artificial bacteriano (BAC) com diferentes comprimentos de repetição do GGGGCC [9,55-57]. Em 2015, dois grupos geraram independentemente ratos BAC que abrigavam 500 (C9-500) ou de 100 a 1000 repetições (C9-100-1000), respectivamente. Esses camundongos exibem apenas acúmulo de focos de RNA e detectam DPRs, sem a neurodegeneração típica da ELA [55,56].

Em 2016, dois outros grupos geraram camundongos transgênicos expressando 450 (C9-450) e 500 repetições, respectivamente. Esses camundongos exibem focos de RNA, acúmulos de DPR, alterações comportamentais e / ou motoras. Especificamente, o primeiro, gerado por Jiang e colegas, apresentou déficits cognitivos a partir de 12 meses. Curiosamente, cerca de 30% das fêmeas do modelo de camundongo de Liu et al. Desenvolveram uma doença rapidamente progressiva com perda de MN e diminuição da sobrevida (entre 20 e 40 semanas de idade). Além disso, quando esses camundongos foram cruzados para camundongos knockout para o C9orf72, o déficit motor foi exacerbado. Embora esses diferentes modelos de camundongos não recapitem totalmente os sinais de C9orf72-ALS, eles foram usados para testar abordagens terapêuticas para C9orf72-ELA.



### **Terapia gênica não baseada em vetores**

O direcionamento de RNA é uma estratégia terapêutica crucial para distúrbios neurodegenerativos, como as formas de FALS descritas acima, nas quais o acúmulo de RNA / proteína e o mecanismo de ganho de função são reconhecidos como a causa central da doença.

Os principais atores dessas abordagens são ASOs e pequeno RNA interferente (siRNA). A capacidade de ASOs e siRNA de se ligar e regular a expressão de mRNA é uma poderosa estratégia terapêutica para distúrbios do SNC, como doença de Alzheimer, doença de Huntington, atrofia muscular espinhal (AME) e ELA. É importante ressaltar que a primeira terapia genética aprovada para AME é um ASO, chamado **Spinraza**. Ele foi projetado para corrigir a emenda e induzir a síntese da sobrevivência da proteína do neurônio motor (SMN) a partir do transcrito do SMN2 [15,59-62]. Atualmente, o Spinraza é administrado por injeção intratecal repetida em crianças (incluindo recém-nascidos) e adultos com AME.

### **Oligonucleotídeos anti-sentido em FALS**

Os ASOs são ácidos nucleicos curtos (13–25 nucleotídeos), de fita simples, que visam e se ligam seletivamente ao mRNA, alterando seu processamento ou transdução. Eles podem exercer um efeito de direcionamento gênico através de diferentes mecanismos. De fato, os ASOs podem impedir a interação com proteínas específicas de ligação ao RNA envolvidas na junção do RNA ou podem induzir a degradação do mRNA pela ativação da ribonuclease H (RNase H).

ASOs não atravessam a barreira hematoencefálica; no entanto, quando entregues diretamente no líquido cefalorraquidiano (LCR), eles são distribuídos por todo o cérebro e medula espinhal. Isso tem apoiado seu uso no tratamento de doenças neurodegenerativas [7,15].

Em 2006, Smith e colegas demonstraram que as injeções diretas no LCR através de injeções intracerebroventriculares de ASO contra SOD1 reduziram o mRNA de SOD1 através da atividade da RNase H, no cérebro e medula espinhal de ratos SOD1, aumentando sua sobrevivência média em 10 dias [7] Essa estratégia foi testada em pacientes com ELA ligada ao SOD1 em um ensaio clínico (NCT01041222). Os resultados deste estudo confirmaram que a administração intratecal do ASO em humanos foi bem tolerada, sem eventos adversos graves.

**O SOD1-ASO, chamado Tofersen**, foi então testado em um ensaio clínico de fase I / II, patrocinado pela Biogen (Biogen Inc., Cambridge, MA EUA), (NCT02623699) que mostrou uma redução nos níveis de proteína SOD1 e uma tendência a desaceleração e declínio clínico da SOD1-ELA tratada.

Foi anunciado um estudo de fase III, que testará a eficácia e segurança deste medicamento. É importante ressaltar que os resultados dos testes pré-clínicos da próxima geração de ASOs contra o mRNA de SOD1 mostraram que era mais eficiente que os ASOs testados anteriormente - prolongando a sobrevivência em mais de 50 dias em ratos SOD1 e em quase 40 dias em B6.SOD1 Camundongos G93A.

Semelhante ao SOD1, diferentes grupos desenvolveram tratamentos para ALS ligada a C9orf72 usando abordagens baseadas em ASOs. ASOs para C9orf72-ELA foram inicialmente testados em células-

tronco pluripotentes induzidas (iPSC), fibroblastos derivados de pacientes com mutações em C9orf72 e em modelos de camundongos [9,48,56,70-72]. Eles foram projetados para interromper a estrutura em gancho da expansão e impedir que as proteínas de ligação ao RNA sejam sequestradas pelas repetições de G4C2 [70] ou para induzir a degradação do RNA mediada pela RNase H [9,56,70,71].

ASOs projetados para se ligarem dentro ou imediatamente a montante do íntron 1 (contendo o HRE) induzem a redução dos focos de RNA e acúmulo de DPRs, preservando os níveis de transcrição, enquanto os que se ligam a jusante do HRE levaram a uma redução significativa da proteína [9,48 70-72]. Assim, os ASOs podem ser projetados para abordar os três mecanismos patológicos não exclusivos responsáveis pelo C9orf72-ELA.

Jiang e colegas demonstraram que uma administração intraventricular única de um C9orf72-ASO que medeia a degradação da RNase H pode reduzir os focos de RNA e agregados de dipeptídeos e melhorar os déficits comportamentais e cognitivos associados à expansão repetida C9orf72 no modelo de mouse C9-450 [9]. É importante ressaltar que, após os testes pré-clínicos neste modelo de camundongo transgênico BAC, a IONIS (Ionis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, CA EUA), em colaboração com a Biogen (Biogen Inc., Cambridge, MA EUA), iniciou a fase clínica I / II (NCT03626012), entregando, através de injeções intratecais repetidas, o IONIS-C9 (BIIB078) em pacientes com ELA.

Assim, os ASOs entregues ao SNC são um tratamento viável para a forma genética da ELA. No entanto, administrações diretas repetidas no LCR aumentam a possibilidade de complicações associadas a essa via de entrega. Além disso, o efeito dos ASOs pode permanecer confinado à medula espinhal e, dado o papel das células não neurais na ELA, pode ser necessária uma administração ampla da terapia no SNC e em outros tecidos, como o músculo esquelético. O uso de vetores virais e, em particular, de vetores de AAV com tropismo neural superará esses problemas, permitindo a transferência genética persistente e global.

### **Interferência de RNA na fALS (ELA Familiar)**

A interferência de RNA (RNAi) - um mecanismo pós-transcricional de silenciamento de genes mediado por pequenas moléculas de RNA interferentes (siRNA) - é outra possível abordagem terapêutica para o RNA alvo. Estes são duplexes de RNA de fita dupla de 19 a 23 nucleotídeos processados dentro da célula e montados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) para direcionar o mRNA celular. Semelhante aos ASOs, o RNAi induz alterações na expressão gênica, promovendo degradação do mRNA, manipulação alternativa de splicing e silenciamento transcricional.

O RNAi pode ser induzido pela introdução de siRNA sintético ou por uma expressão mediada por vetor dos RNAs precursores em gancho de cabelo curto (shRNAs), que são subsequentemente processados no citoplasma para siRNA. O siRNA também pode ser expresso por microRNA artificial, no qual o shRNA é incorporado em sequências dos RNAs reguladores endógenos curtos não codificadores (microRNA). O shRNA ou microRNA artificial produz efeitos estáveis, uma vez que são produzidos continuamente dentro das células, ao contrário dos efeitos do siRNA sintético que são diluídos com a divisão celular ou degradados.

O RNAi para SOD1-ELA foi testado para atingir especificamente o alelo SOD1 mutante usando siRNA *in vitro* e depois *in vivo*, usando plasmídeos shRNA entregues em camundongos do tipo selvagem por meio de um protocolo de transfecção hidrodinâmica. Essa abordagem resultou em segmentação limitada de tecido [78].

O siRNA dirigido contra o mRNA SOD1 humano mutante foi testado em camundongos SOD1-ALS após aplicação local no nervo ciático. Com esse método, o siRNA é transportado de forma retrógrada para o pericário dos neurônios motores, levando à inibição do mRNA de SOD1 mutante nos camundongos ALS de cópia baixa B6.SOD1-G93A.

No entanto, as dificuldades de fornecer siRNA de maneira estável a tipos celulares específicos dificultaram a transdução dessas abordagens, e o uso do vetor viral foi assim explorado para o tratamento de fALS.

A rápida degradação de ácidos nucleicos não modificados pelas endonucleases requer altas doses de nucleotídeos para um efeito terapêutico. Isso pode levar a toxicidade inesperada ou a um aumento dos efeitos fora do alvo. Várias modificações químicas foram, portanto, testadas para superar esses obstáculos. Em particular, diferentes substâncias químicas foram desenvolvidas para protegê-las da degradação da nuclease e / ou para atingir a entrega direcionada em concentrações apropriadas [68]. Embora existam vantagens dessas modificações, elas podem levar a complicações associadas à estabilidade, captação celular e efeitos colaterais indesejáveis decorrentes da não orientação e imunoestimulação.

A entrega e distribuição de ASOs ou plasmídeos que codificam para siRNA podem ser otimizados conjugando-os a vários veículos, como N-acetilgalactosamina, dendrímero de octaguanidina, peptídeos que penetram nas células ou usando lipossomos ou nanopartículas [81-83]. Atualmente, algumas dessas abordagens estão sendo investigadas em contextos pré-clínicos e, por exemplo, um ASO conjugado com um peptídeo penetrante em células foi testado em um modelo severo de camundongo da SMA, prolongando a sobrevivência dos camundongos tratados [84]. Estudos futuros que otimizam a entrega e a biodistribuição de ácidos nucleicos *in vivo* fortalecerão o potencial terapêutico dessas abordagens para MNDs. Paralelamente, os vetores virais estão sendo explorados como uma alternativa concreta para entregar e expressar de forma estável transgenes, incluindo siRNA e ASOs.

### **Vetores virais para terapia genética na ELA**

O uso de vetores virais para administrar terapêutica mudou completamente o cenário da terapia genética para MNDs. Como mencionado acima, a barreira hematoencefálica é um fator limitante para a entrega de genes no SNC que impede a entrada de moléculas terapêuticas e a transferência de genes mediada por vírus foi testada para superar essa limitação. Os vetores derivados do lentivírus e do AAV são atualmente os mais frequentemente usados em ensaios clínicos de terapia genética para doenças neurodegenerativas. O que torna os vetores virais tão atraentes para MNDs e muitas condições neurológicas? É sua alta eficiência na transdução de neurônios. Entre os vetores virais, o AAV é

frequentemente usado em ensaios clínicos para doenças raras (isto é, para o tratamento da hemofilia A e B - NCT03588299, NCT03001830, NCT02396342, NCT01620801 e NCT03569891), distúrbios neurológicos (ou seja, doença de Parkinson - NCT01621581, NCT01973543 NCT03562494, NCT03065192, NCT02418598 e doença de Alzheimer - NCT00087789, NCT03634007) e são perspectivas concretas de tratamento para pacientes que sofrem de ELA.

### **Terapia gênica mediada por LV (Lentivirais)**

Os vetores lentivirais (LV) derivam do lentivírus, um membro da família Retroviridae. Eles se distinguem em dois grupos: o primata, baseado no vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os vetores não primatas, como os derivados do vírus da anemia infecciosa dos equídeos (EIAV).

Existem diferentes gerações de VE de acordo com o plasmídeo de embalagem utilizado para a sua produção. A última geração de VE (terceira geração) tem um genoma simplificado organizado nos genes gag, pol e env, codificando para as proteínas estruturais do capsídeo viral, as proteínas responsáveis pela síntese do DNA viral e o envelope viral, respectivamente. Além disso, o genoma viral contém duas repetições terminais longas (LTR), com elementos necessários para a expressão gênica, transcrição reversa e integração ao cromossomo hospedeiro [88]. Para tornar esses vetores úteis e eficientes para a terapia genética e inofensivos para os seres humanos, muitos genes acessórios e reguladores, como tat, responsável pela oncogênese, ou vpr, envolvidos na apoptose, foram eliminados.

O VE foi considerado o vetor de escolha para a terapia genética devido à sua capacidade de transduzir células em divisão e não-divisão (como neurônios), sua capacidade de penetrar naturalmente em uma membrana nuclear intacta e sua grande capacidade de clonagem (8–10 Kb ). O VE pode induzir uma expressão estável a longo prazo através da integração nos cromossomos das células hospedeiras, na ausência de inflamação [91].

Existem diferentes pseudotipos de VE com envelopes diferentes, responsáveis pelo tropismo viral. A mais utilizada é a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), que possui um amplo tropismo in vitro e preferência pelo tropismo neuronal in vivo. No entanto, embora esse vetor tenha alta eficiência e estabilidade na transdução, seu tropismo não seletivo e dificuldade para entrar no SNC sem métodos invasivos de entrega, modera seu uso como vetor de terapia genética. Curiosamente, o VE pseudotipado com a glicoproteína do envelope do vírus da raiva (RVG) transduz neurônios motores in vivo por meio de transporte retrógrado - uma propriedade interessante para testar tratamentos para a ELA.

Ao combinar diferentes domínios de VSV-G e RVG, os VE com retrógrado altamente eficiente (HiRet) ou propriedades de transferência de genes retrógrados específicos de neurônios (NeuRet) foram gerados [94]. O LV-HiRet, pseudotipado com glicoproteína de fusão B tipo 2, pode transduzir com eficiência neurônios motores na medula espinhal lombar quando injetado nos músculos de ratos do tipo selvagem. No entanto, a entrega intramuscular de vetores virais poderia provavelmente ser prejudicada pela deservação neuromuscular e transporte axonal defeituoso, sinais típicos observados na ELA. A transdução desses vetores para o tratamento de pacientes com ELA permanece, portanto, questionável.

Os VE foram utilizados para testar o tratamento de FALS, utilizando a abordagem RNAi. Raoul e colegas demonstraram que a injeção intraespinal bilateral de um silenciamento de SOD1 mediado por RNAi por VSV-G LV em camundongos SOD1-G93A com 40 dias de idade, reduziu o início da doença em 20% e prolongou a progressão da doença, protegendo a perda de MN. Independentemente, Ralph e colegas demonstraram que as injeções intramusculares de um RVG-LV que codifica um shRNA para SOD1 induzem um atraso no início dos sintomas da ALS em mais de 100% e aumentam a sobrevivência em 77% em camundongos SOD1-G93A injetados aos sete dias de idade. Esses estudos não foram transduzidos para as clínicas, mas estabeleceram as bases para estratégias de silenciamento mediadas por AAV para SOD1-ELA.

Embora os VE tenham muitas características que os tornem adequados para a terapia gênica, eles têm desvantagens que limitam seu uso para a transferência de genes *in vivo*. Isso inclui área transduzida limitada, em torno de 500 a 700  $\mu\text{m}$  do local da administração, seu grande tamanho (100 nm de diâmetro), baixos títulos virais e tropismo amplo. Além disso, sua propriedade de integrar o genoma na cromatina celular do hospedeiro é um risco para mutagênese. No entanto, a integração do genoma faz desses vetores uma escolha favorável para a terapia gênica *ex vivo*, como mostrado por Suzuki e Svendsen, que demonstraram os benefícios terapêuticos da terapia gênica *ex vivo* em ratos SOD1. Atualmente, essa abordagem está sendo investigada em um ensaio clínico para ELA no Cedars-Sinai Medical Center, Estados Unidos, no qual as células-tronco mesenquimais são corrigidas pelo VE com transgene de fator neurotrófico derivado da linha de células gliais (GNDF) e são infundidas na coluna vertebral do paciente. cordão.

### **Terapia gênica mediada por AAV**

Os vetores virais derivados do vírus AAV são amplamente utilizados para transferência gênica *in vivo* em distúrbios neurodegenerativos. O AAV é um vírus que não possui envelope e que contém DNA de fita simples, pertencente à família Parvoviridae.

O genoma viral é de cerca de 4,7 Kb e compreende dois quadros de leitura abertos, genes *rep* e *cap*, flanqueados por repetições terminais invertidas (ITRs) nas duas extremidades. O gene *rep* codifica quatro proteínas envolvidas na replicação, transcrição, integração e encapsidação de AAV. O gene *cap* produz três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3), que interagem para formar um capsídeo de uma simetria icosaédrica. O gene *cap* codifica uma proteína adicional não estrutural chamada Proteína Ativadora de Montagem (AAP), essencial para o processo de montagem da cápside. Para produzir vetores AAV recombinantes, todas as sequências virais são eliminadas, exceto as ITRs que funcionam como sinais de empacotamento e iniciando a síntese da segunda fita nas células hospedeiras. Isso representa uma importante vantagem de segurança.

Os AAV transduzem células que se dividem e não se dividem e mediam a expressão duradoura do transgene sem efeitos adversos. Os AAV também exibem vantagens importantes em comparação ao VE, incluindo um tropismo tecidual específico dos diferentes sorotipos, um perfil de segurança mais alto e níveis de expressão de transgene, uma maior disseminação de vetores e a persistência de seu genoma predominantemente como episódios extra-cromossômicos, reduzindo assim a possibilidade de mutagênese de inserção [16].

Centenas de sorotipos de AAV foram descritos e muitos têm como alvo tecidos específicos. Os diferentes sorotipos são definidos pela estrutura de aminoácidos da proteína do capsídeo que são responsáveis para o tropismo tecidual, distribuição, bem como a suscetibilidade a anticorpos circulantes [106]. Entre esses sorotipos, aqueles usados principalmente em testes pré-clínicos para ELA por sua capacidade de atingir MNs, são os sorotipos 9.

A expressão gênica mediada por AAV pode atingir seletivamente neurônios ou células gliais com o uso de promotores específicos de neurônios ou gliais, conforme descrito anteriormente para vetores de VE e adenovirais. O transporte axonal foi inicialmente explorado para a disseminação do vetor no SNC, em uma direção retrógrada e / ou anterógrada. Os vetores virais podem cruzar conexões sinápticas e transduzir neurônios em diferentes regiões. O sorotipo 9 do AAV, por exemplo, sofre transporte anterógrado e retrógrado, o que contribui para sua ampla distribuição em todo o SNC. Os vetores de AAV que embalam um genoma de fita dupla também têm uma eficácia de transdução aumentada. Esses são chamados vetores AAV auto complementares que oferecem vantagens substanciais entre os genomas de cadeia simples (ss) padrão para a transdução rápida e eficiente em muitos órgãos, incluindo o cérebro, mesmo que reduz a capacidade transgênica para cerca de 2,5 Kb.

Um avanço no tratamento de MNDs surgiu com a descoberta de que vetores virais sc, derivados do AAV9, atravessam a barreira hematoencefálica em modelos animais. Esse método transduz com eficiência o SNC, incluindo MNs da coluna vertebral, após a entrega sistêmica. Utilizando esta abordagem, foi demonstrado que a administração intravenosa (IV) de um vetor AAV9 que codifica o cDNA Survival of Motor Neuron resgata um modelo animal grave de AME. Notavelmente, essa estratégia terapêutica mostrou resultados promissores em pacientes com AME e recebeu recentemente uma autorização de comercialização da FDA para o tratamento de pacientes pediátricos.

A abordagem AAV9-SMN está atualmente sendo testada em ensaios clínicos para formas mais antigas de AME (NCT03381729), abrindo perspectivas para a aplicação de métodos semelhantes na ELA.

Recentemente, os vetores AAV9 foram usados para fornecer shRNA ao SOD1 em camundongos SOD1-G93A após injeção IV no nascimento, o que prolongou a vida média dos camundongos tratados em 39%. Essa abordagem reduziu a síntese do SOD1 mutante, retardando o início da doença e retardando a progressão da doença e atualmente está em desenvolvimento pré-clínico (AVXS-301-AveXis, Bannockburn, IL EUA). Outros grupos usaram um sorotipo AAV rh10, que também transduz com eficiência o CNS, para fornecer microRNA artificial (miR) em camundongos SOD1. Wang e colegas injetaram intratecalmente um AAVrh10-miR em camundongos B6.SOD1-G93A em cerca de 60 dias de idade e prolongaram sua sobrevivência média em 11%. Paralelamente, Borel e colegas testaram um vetor semelhante, carregando duas cópias da sequência miR para SOD1, por injeção intravenosa em camundongos SOD1-G93A. Os ratos foram tratados com cerca de 60 dias de idade e sua vida média foi prolongada em 21%. Um AAV9 também foi usado para entregar duas seqüências de miR para SOD1 em camundongos recém-nascidos SOD1-G931, usando entrega intra-cerebroventricular, que prolongou a sobrevivência média em 50%. É importante ressaltar que a injeção de um AAVrh10-miR em SOD1 foi comprovadamente eficaz em macacos cinomolgos sem mostrar efeitos adversos.

Além disso, com base nesses estudos, as abordagens mediadas pelo AAVrh10 para silenciar o SOD1 estão atualmente em desenvolvimento pré-clínico na Voyager Therapeutics Inc, Cambridge, MA EUA (VY-SOD101) e na Apic Bio Inc., Cambridge, MA EUA (APB-102).

O AAVrh10 também foi utilizado para entregar sequências AS para silenciar a expressão de SOD1 em camundongos SOD1-G93A. O silenciamento foi baseado na ativação da via de deterioração mediada por absurdo (NMD), um mecanismo de vigilância de mRNA que detecta e degrada transcrições anormais [126]. As sequências AS foram projetadas para induzir o pular do exon 2 do pré-mRNA humano de SOD1, a fim de produzir um mRNA com um códon de parada prematuro, ativando a degradação do RNA [127]. As sequências de AS foram entregues usando um pequeno RNA nuclear U7 [128] e foram injetadas através de administração combinada IV e intracerebroventricular das partículas de AAVrh10. Essa abordagem mediou o aumento da sobrevivência em camundongos SOD1-G93A injetados no nascimento ou aos 50 dias de idade (92% e 58%, respectivamente). A estratégia AAV-U7-AS combina as propriedades dos vetores ASO e AAV e é uma alternativa viável à entrega de siRNA mediada por vírus.

Finalmente, a expressão de sequências de silenciamento mediada por AAV também foi testada em C9orf72-ALS. Peters e colegas testaram o silenciamento do transcrito C9orf72 mediado por AAV9 em culturas de neurônios corticais primários de camundongos transgênicos C9-500 BAC, usando sequências artificiais de miR. Usando essa abordagem, eles poderiam atenuar a expressão do transgene C9orf72 BAC e dos dipeptídeos poli (GP) [55]. Recentemente, o Biotech uniQure (uniQure Inc., Lexington, MA EUA) demonstrou que o miR artificial pode reduzir os focos de RNA dos sentidos e os transcritos C9orf72 contendo repetidos após injeção intrastriatal em camundongos C9-100-1000 com cerca de 90 dias de idade. Eles usaram um vetor AAV5 direcionado apenas a certas regiões do cérebro, como córtex frontal e área do mesencéfalo.

**Os resultados dos testes pré-clínicos das abordagens de terapia gênica mediada por AAV para SOD1- ou C9orf72-ALS abrem uma perspectiva concreta para a transdução dessas abordagens para pacientes com ELA.**

### **Edição de genoma para fALS (ELA Familiar)**

As abordagens de edição do genoma foram recentemente testadas in vitro e in vivo, para diferentes doenças genéticas, incluindo SOD1 e C9orf72-ELA. O mais atual é o uso da endonuclease Cas9 guiada por RNA a partir do sistema Cas associado a repetições palindrômicas curtas, regularmente espaçadas e agrupadas (CRISPR), que corrige com precisão os defeitos genéticos. Usando vetores AAV que expressam um Cas9 curto, derivado de *Staphylococcus aureus*, e RNA de guia único direcionado ao exod 2 de SOD1, a expressão de SOD1 foi interrompida em camundongos SOD1-G93A [135]. Essa abordagem prolongou a sobrevivência dos ratos em 30 dias, no entanto, induziu um aumento de sete ou 14 vezes dos indels no gene SOD1 humano nos MNs torácicos ou lombares, respectivamente. Os efeitos dessa alteração genômica em humanos precisam ser cuidadosamente avaliados.

Recentemente, um plasmídeo CRISPR-Cas9 foi nucleofectado em iPSCs de pacientes com C9-ELA e excluiu a expansão repetida, oferecendo uma prova de conceito para correção genômica nessa doença.

**Embora a edição do genoma seja o Santo Graal para alcançar a correção definitiva de uma mutação genética, alguns aspectos, como a especificidade do alvo e a imunogenicidade, precisam ser gerenciados para garantir uma transdução segura para os seres humanos.**

### **Entrega de fatores neurotróficos como tratamento potencial para todos os casos de ELA**

A maior parte dos casos de ELA é esporádica e o mecanismo patológico preciso ainda não é conhecido. Uma das estratégias desenvolvidas para direcionar mecanismos comuns ao FALS e ao SALS é aumentar a neuroproteção por fatores tróficos.

Os fatores neurotróficos têm um papel importante no desenvolvimento, plasticidade, neurogênese, doença e lesão do sistema nervoso. Portanto, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator neurotrófico derivado da linha celular glial (GDNF), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram usados para tratar a ELA. A transferência de genes virais pode fornecer e levar à expressão transgênica desses fatores neurotróficos, aumentando sua biodisponibilidade. Wang e colegas demonstraram que a expressão do GDNF mediada por AAV2 após injeção intramuscular, atraso no início da doença e sobrevida prolongada em camundongos SOD1-G93A.

Da mesma forma, em 2003, Kaspar et al. demonstraram que a administração de IGF-1 mediada por AAV e VSV-G LV aumentou a sobrevivência de camundongos SOD1-G93A. Em 2004, Azzouz et al. relataram que uma única injeção de RVG-LV que expressa VEGF em vários músculos atrasava o início e retardava a progressão da ELA em camundongos SOD1-G93A, mesmo quando o tratamento foi iniciado no início da doença. Dois outros estudos utilizaram um vetor baseado em AAV2 para administrar IGF-1 por via intraparenquimatosa em camundongos SOD1-G93A e rato, que protegiam o NM e preservavam a função neuromuscular.

Além disso, Dodge et al. mostrou que a entrega de AAV1- e AAV2-IGF-1 ao CNS de camundongos SOD1-G93A é suficiente para retardar a doença e a sua progressão e demonstrou pela primeira vez que o IGF-1 atenua a atividade patológica de células não neuronais que contribuem para a progressão da doença.

Posteriormente, o mesmo grupo avaliou o efeito da entrega de VEGF ou IGF-1 mediada por AAV4, que mostrou declínio motor atrasado e sobrevida significativamente prolongada em camundongos SOD1-G93A. Curiosamente, a entrega de ambos os fatores neurotróficos simultaneamente não foi mais eficaz do que os tratamentos únicos com IGF-1 ou VEGF. No entanto, a combinação de fator neurotrófico para o tratamento de ALS ou outras MNDs, como a AME parece uma perspectiva promissora. Além disso, o uso de ferramentas de terapia gênica pode atingir diretamente a mutação genética e, paralelamente, atuar em outras vias importantes que protegem outros mecanismos de doenças. Atualmente, essas abordagens estão sendo exploradas com mais detalhes.





## **Conclusões**

Diferentes abordagens de terapia genética desenvolvidas para o tratamento da ELA estão sendo vigorosamente adotadas. Atualmente, ASOs para duas formas genéticas estão sendo testados em ensaios clínicos e o uso de terapia gênica mediada por vírus para ELA é especialmente promissor para uma expressão específica e estável do agente terapêutico no SNC. Embora os vetores de VE tenham sido utilizados em modelos animais para estudos de prova de conceito, as abordagens mediadas por AAV mantêm perspectivas translacionais concretas, em particular para casos de FALS.

Várias estratégias para o tratamento de FALS estão sendo desenvolvidas e algumas delas - após o sucesso da estratégia de terapia genética para AME - podem entrar em ensaios clínicos em um futuro próximo. São necessários esforços contínuos de pesquisa para identificar mecanismos patológicos para a sALS e desenvolver abordagens terapêuticas apropriadas. Com os vetores de AAV, será possível direcionar tipos específicos de células envolvidas na doença e fornecer diferentes tipos de transgenes - silenciar, adicionar fatores terapêuticos ou corrigir geneticamente. Os esforços persistentes de pesquisa nessa direção poderiam levar a intervenções em caminhos comuns nos sALS e fALS, mas também, esperançosamente, em outras DNMs.